

**Während der akuten Abstoßung experimenteller
Nierentransplantate wird die Azetylcholinsynthese-
maschinerie intravasaler Leukozyten hochreguliert**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Andreas Hecker
aus Kreuztal**

Gießen 2009

**Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und
Kinderchirurgie
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen
Sektion Experimentelle Chirurgie
Leitung: Frau Prof. Dr. rer. nat. V. Grau**

**Gutachter: Frau Prof. Dr. Grau
Gutachter: Prof. Dr. Schranz
Tag der Disputation: 17.07.2009**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten.“

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACh	Azetylcholin
AChE	Azetylcholinesterase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigen presenting cell, antigenpräsentierende Zelle
Aqua ad inj.	Aqua ad injectabilia
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	<i>bone morphogeneic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cChAT	<i>common choline acetyltransferase</i>
CHT 1	<i>high affinity choline transporter 1</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CTL	<i>choline transporter-like proteins</i>
DA	Dark Agouti
DAB	3,3-Diaminobenzidin
dbcAMP	Dibutyryl-zyklisches Adenosinmonophosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LEW	Lewis
LPS	Lipopolysaccharid
mAChR	muskarinischer Azetylcholinrezeptor
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
nAChR	nikotinischer Azetylcholinrezeptor
p.a.	pro analysi
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pChAT	<i>peripheral choline acetyltransferase</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RAMP	<i>receptor activity modulating protein</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TF	<i>tissue factor</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPBS	PBS plus TWEEN
TTBS	TBS plus TWEEN
VACHT	vesikulärer Azetylcholintransporter
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VE	voll entmineralisiert
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	08 - 24
1.1 Verschiedene Formen der Organabstoßung.....	08 - 09
1.2 Die akute Abstoßung von Nierentransplantaten.....	09 - 15
1.2.1 Zeitverlauf der akuten Transplantatabstoßung im Tiermodell.....	09 - 11
1.2.2 Die Rolle von T-Lymphozyten bei der akuten Transplantatabstoßung.....	11 - 12
1.2.3 Die Rolle von Endothelzellen bei der akuten Transplantatabstoßung.....	12 - 13
1.2.4 Die Rolle von Monozyten bei der akuten Transplantatabstoßung.....	13 - 15
1.3 Der Azetylcholin (ACh)-Syntheseapparat.....	15 - 24
1.3.1 Cholinazetyltransferase (ChAT).....	15 - 18
1.3.2 Der hochaffine Cholintransporter (CHT1).....	18 - 19
1.3.3 Die Wirkung von Azetylcholin (ACh) auf das Immunsystem.....	20 - 22
1.3.3.1 Proinflammatorische Wirkungen über muskarinische ACh-Rezeptoren	
1.3.3.2 Antiinflammatorische Wirkungen über nikotinische ACh-Rezeptoren	
1.3.4 Der cholinerge, antiinflammatorische Regelkreis.....	22 - 23
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2 Material und Methoden.....	25 - 42
2.1 Material.....	25 - 31
2.1.1 Reagenzien.....	25 - 26
2.1.2 Geräte & Kleinmaterial.....	26 - 27
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	27 - 31
2.2 Methoden.....	31 - 42
2.2.1 Transplantation.....	31 - 33
2.2.1.1 Versuchstiere.....	31 - 32
2.2.1.2 Transplantation von Rattennieren.....	32
2.2.1.3 Organperfusion.....	32
2.2.1.4 Zellaufreinigung.....	32 - 33
2.2.1.5 Fixierung.....	33
2.2.1.6 Einbettung der Nierentransplantate.....	33
2.2.2 Immunhistochemie.....	33 - 37
2.2.2.1 Silanisierung der Objektträger.....	33
2.2.2.2 Anfertigung der Schnitte und Entparaffinierung.....	33
2.2.2.3 Einzelfärbungen.....	33 - 35
2.2.2.4 Doppelfärbungen.....	36
2.2.2.5 Nachweis der Spezifität der immunhistochemischen Färbung.....	36
2.2.2.6 Gegenfärbung und Eindecken der Schnitte.....	36 - 37
2.2.3 Proteinbiochemie.....	37 - 40
2.2.3.1 Probenaufbereitung.....	37
2.2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes.....	37 - 38
2.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese.....	38 - 39
2.2.3.4 Blotting.....	39
2.2.3.5 Statistische Auswertung der Westernblot-Experimente.....	40
2.2.4 Nachweis und Quantifizierung von mRNA in mononukleären Leukozyten.....	40 - 42
2.2.4.1 RNA-Isolierung.....	40

2.2.4.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA).....	40 - 41
2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41 - 42
2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.2.4.5 Sequenzierung der PCR-Produkte.....	42
3 Ergebnisse.....	43 - 52
3.1 Immunhistochemischer Nachweis von CHT1, cChAT und pChAT.....	43 - 48
3.1.1 Unbehandelte Nieren	43 - 44
3.1.2 Isogen transplantierte Nieren.....	44
3.1.3 Allogen transplantierte Nieren.....	44 - 47
3.1.4 Doppelfärbungen allogener Nierentransplantate am 4. postoperativen Tag.....	47 - 48
3.1.5 Überprüfung der Spezifität der Antikörper gegen CHT1, cChAT und pChAT in der Immunhistochemie.....	48
3.2 Nachweis von CHT1, cChAT und pChAT im Westernblot.....	49 - 50
3.3 Nachweis von CHT1- und cChAT-mRNA in intravasalen, mononukleären Leukozyten.....	51
3.4 ACh-Gehalt in intravasalen mononukleären Leukozyten aus isogen und allogen transplantierten Nieren.....	52
4 Diskussion.....	53 - 63
4.1 Vorteile des Tiermodells.....	54
4.2 Intravasale mononukleäre Leukozyten exprimieren CHT1, cChAT und pChAT.....	54 - 55
4.3 pChAT ist zwar auf Proteinebene, nicht jedoch auf mRNA Ebene nachweisbar.....	56
4.4 Funktionen von CHT1 und cChAT.....	56 - 57
4.5 Quellen intravasalen Azetylcholins.....	58 - 60
4.6 Hypothesen zur immunologischen Funktion leukozytären Azetylcholins.....	60 - 62
4.7 Schlußfolgerungen.....	63
5 Literatur.....	64 - 74
6 Zusammenfassung.....	75 - 76
6.1 Während der akuten Abstoßung experimenteller Nierentransplantate wird die Azetylcholinsynthesemaschinerie in intravasalen Leukozyten hochreguliert.....	75
6.2 Acetylcholine synthesis machinery is upregulated in intravascular leukocytes during experimental renal allograft rejection.....	76
7 Lebenslauf.....	77 - 78
8 Danksagung.....	79

1. Einleitung

1.1 Verschiedene Formen der Organabstoßung

Auch wenn es durch immunsuppressive Therapie gelingt, bei den meisten Patienten eine fulminante Abwehrreaktion gegen ein transplantiertes Organ zu verhindern, besteht permanent eine latente Abstoßungsbedrohung. 20-50 % aller Nierentransplantate gehen innerhalb der ersten 5 Jahre post operationem verloren (18). Man unterscheidet drei Formen der Transplantatabstoßung:

- a) Hyperakute Abstoßung: Präformierte Antikörper z.B. bei ABO-Inkompatibilität, Sensibilisierung durch vorhergehende Schwangerschaft oder Bluttransfusion führen zu Endotheldestruktionen, intravasalen Granulozyten- und Thrombozytenaggregaten, multiplen Einblutungen in das Interstitium und Fibrinniederschlägen. Antikörpern gegen *major histocompatibility complex (MHC)*-Antigene scheinen die größte Rolle zuzukommen. Die Organe werden meist schon intraoperativ zerstört.

In der Klinik kann diese Reaktion durch den Ausschluss präformierter Antikörper in verschiedenen Tests (*complement-dependent cytotoxic-assay* (116, 152), *flow cytometry crossmatch*, *HLA(human leukocyte antigen)-ELISA* (16, 83), *HLA antigen bead flow cytometry* (120, 121)) präoperativ vermieden werden.

- b) Akute Abstoßung ist durch eine rasch einsetzende Symptomatik und weniger durch den zeitlichen Zusammenhang zur Transplantation definiert. Sie kann auch Jahre nach der Operation einsetzen und ist bei Nierentransplantatempfängern durch Fieber, Verschlechterung des Allgemeinzustands, Schwellung und Druckdolenz im Nierenlager charakterisiert. Histologisch typisch sind perivasale, leukozytäre Infiltrate aus T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, wenigen neutrophilen sowie eosinophilen Granulozyten.
- c) Chronische Abstoßung ist die progrediente Funktionsminderung des Transplantates, die sich beim Mensch über Monate bis Jahre post operationem entwickeln kann. Bei Nierentransplantaten ist diese Form der Abstoßung histologisch im Wesentlichen durch Intimaproliferation mit Gefäßobliteration und durch Tubulusatrophie gekennzeichnet (67). Gründe für die Entstehung der chronischen Abstoßung auch nach primär komplikationslosem postoperativem Verlauf sind sowohl immunologischer, als auch nicht-immunologischer Natur.

Von Bedeutung ist, dass die akute und die chronische Abstoßung fließend ineinander übergehen und akute Abstoßungsreaktionen chronische induzieren können (78, 163). Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit ist auf die akute Transplantatabstoßung gelegt.

1.2 Die akute Abstoßung von Nierentransplantaten

1.2.1 Zeitverlauf der akuten Transplantatabstoßung im Tiermodell

Das hier verwendete experimentelle Modell der akuten Abstoßung von Nierentransplantaten eignet sich besonders zur Klärung der Rolle von Monozyten bei akuten Abstoßungsprozessen. Dabei wurden allogene Nieren von Dark Agouti (DA)-Ratten orthotop in Lewis (LEW)-Ratten transplantiert. Als Kontrollen wurden LEW-Nieren in LEW-Ratten (isogen) transplantiert.

Aufgrund der Veränderungen im Nierengewebe kann die akute Transplantatabstoßung in drei Phasen unterteilt werden (58):

1. Phase: Die 1. Phase umfasst den 1. und 2. postoperativen Tag. Kleine Infiltrate umgeben die Blutgefäße der Niere. Mit dem monoklonalen Antikörper ED1, der gegen ein CD68-artiges Antigen gerichtet ist, lassen sich die meisten Zellen des Monozyten-/Makrophagensystems der Ratte darstellen (30). Mit ED1 gefärbte Makrophagen stellen den Großteil des Infiltrates. Interstitium und Parenchym der Nieren sind kaum infiltriert. Die Infiltrate aus mit ED1 gefärbten Makrophagen sind nach allogener und nach isogener Transplantation ähnlich stark ausgebildet und gehen wohl auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden (1.2.3) zurück. Dennoch ist schon innerhalb der ersten 24 Stunden nach Nierentransplantation eine akute Abstoßungsreaktion daran erkennbar, dass im perivasalen Infiltrat mehr T-Lymphozyten mit dem monoklonalen Antikörper R73, der gegen den α/β -T-Zellrezeptor (TCR) gerichtet ist, nachzuweisen sind.

2. Phase: Am 3. postoperativen Tag nach allogener Nierentransplantation kommt es zu einer massiven Zunahme des perivasalen Infiltrates und zu einer Ausbreitung des Infiltrates in das Niereninterstitium. Das Nierengewebe wird schließlich am 4. Tag post operationem homogen mit Makrophagen und T-Lymphozyten durchsetzt. Grau et al. (58) konnten zeigen, dass das Infiltrat im gesamten postoperativen Verlauf nach Nierentransplantation doppelt so viele Makrophagen wie T-Lymphozyten enthält.

Die perivasalen Infiltrate aus Makrophagen und T-Lymphozyten nehmen in isogen transplantierten Nieren nur leicht zu. In Abb. 1 sind am 4. Tag nach Nierentransplantation allogene Nierentransplantate isogenen gegenübergestellt.

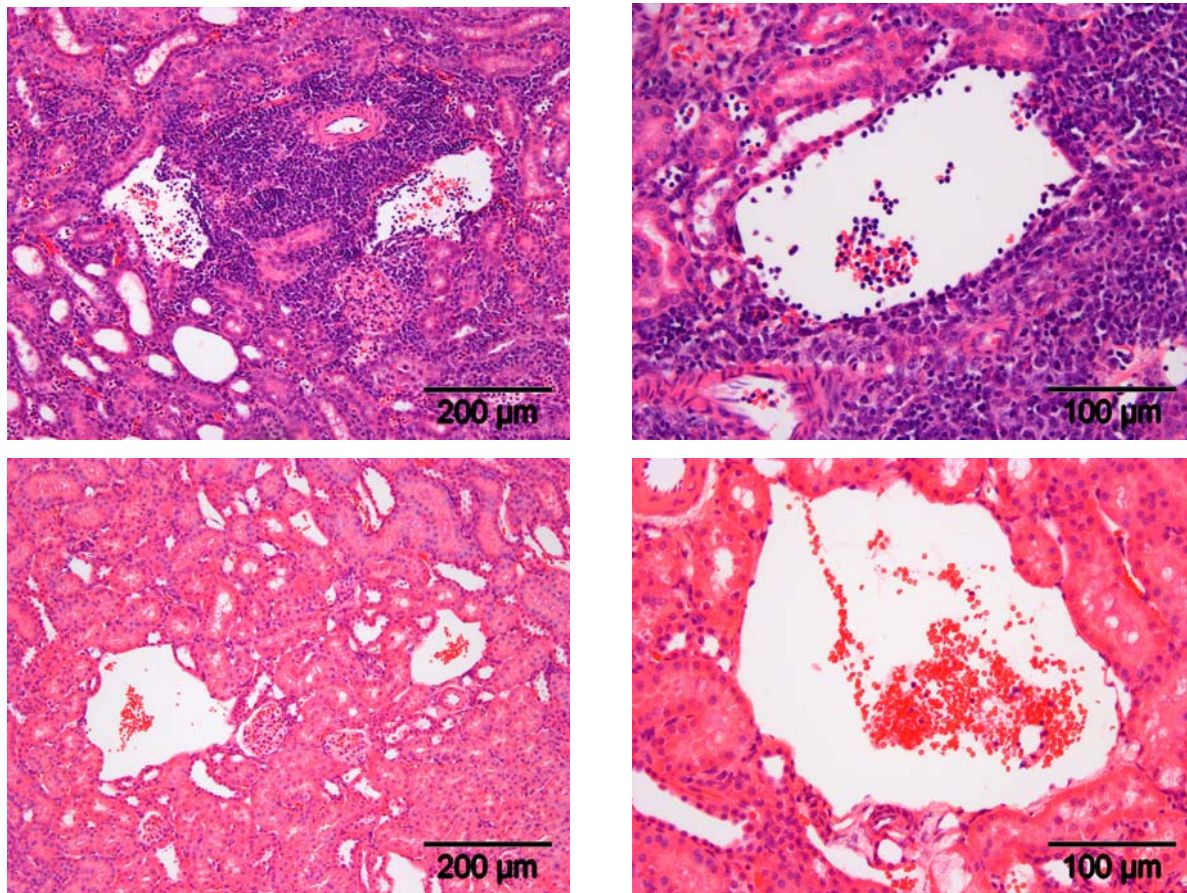


Abb. 1: Gegenüberstellung von Hämalaun-Eosin-gefärbten Nierentransplantaten am 4. postoperativen Tag. Die obere Reihe zeigt Gefäßregionen nach allogener Nierentransplantation. In der unteren Reihe sind Gefäßregionen eines isogenen Nierentransplantates dargestellt.

3. Phase: Von großer Bedeutung ist der Zeitraum vom 4. zum 5. Tag post transplantationem, in dem es zur irreversiblen Transplantatzerstörung kommt. Destruktionen werden in Form von dilatierten Tubuli mit apikal abgeschilfertem Bürstensaum deutlich. Außerdem treten massive Nekrosen und Gewebsseinblutungen auf. Das Interstitium des allogenen Nierentransplantates ist homogen leukozytär durchsetzt. Die Infiltration des Transplantates durch Makrophagen nimmt weiter zu, während der Anteil der T-Lymphozyten leicht abnimmt (58). Die Tiere sterben am 6.-8. postoperativen Tag. Im Gegensatz dazu zeigen sich im isogenen Nierentransplantat weder Destruktionen noch Infiltrate.

Auch im Intravasalraum zeigen sich charakteristische Veränderungen: Während die Zahl der intravasalen mononukleären Leukozyten in der 1. Phase der Abstoßungsreaktion weitgehend unverändert ist, kommt es ab der 2. Phase zu einer deutlichen intravasalen Akkumulation von

mononukleären Leukozyten. Die intravasalen mononukleären Leukozyten können mittels intensiver Perfusion aus dem Transplantat gewonnen und untersucht werden.

In durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass am 4. Tag nach allogener Nierentransplantation etwa 73 % der intravasalen Leukozyten aus allogenen Nierentransplantaten Monozyten sind (58, 59). Mit 22 % stellen die Lymphozyten die zweitstärkste Subpopulation dar.

1.2.2 Die Rolle von T-Lymphozyten bei der akuten Transplantatabstoßung

Im Folgenden werden einige immunologische Vorgänge bei akuten Abstoßungsprozessen von vaskularisierten Organen erläutert. Bewusst wird das Hauptaugenmerk auf mögliche Aktivierungswege im Intravasalraum gelegt, da dieses Kompartiment in der vorliegenden Arbeit untersucht wird. Die immunologischen Vorgänge im Interstitium werden dagegen weitgehend außer Acht gelassen. Dennoch soll die Bedeutung interstitieller Abstoßungsvorgänge nicht geleugnet werden.

CD(*cluster of differentiation*) 4^+ T-Helferzellen bestimmen die Spezifität der Immunantwort gegen ein allogenes Transplantat (148). Die Aktivierung von CD 4^+ T-Helferzellen erfolgt durch die Präsentation alloantigener Peptide auf intakten MHC-Klasse-II-Antigenen von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) des Spenders (25, 144) oder durch das allogene MHC-Klasse-II-Antigen selbst (direkter Weg). Alternativ können APC des Empfängers allogene Peptide über MHC-Klasse-II-Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren und Empfänger-T-Zellen aktivieren (indirekter Weg) (2, 39, 100, 141, 157).

Im Intravasalraum kommen als APC für den „direkten Weg“ der T-Zell-Aktivierung MHC-II $^+$ Endothelzellen in Betracht. Als MHC-II $^+$ Zellen könnten auch Monozyten des Empfängers intravasal T-Zellen indirekt aktivieren. *In vitro* wurde außerdem gezeigt, dass Monozyten Membranbestandteile allogener Endothelzellen in ihre eigene Zellmembran einbauen können und damit allogene MHC-Moleküle T-Zellen „semi-direkt“ präsentieren können (29, 174).

Auf die Stimulierung durch direkte und indirekte Antigenpräsentationen reagieren CD 4^+ T-Zellen u.a. mit Interferon(IFN)- γ Sekretion. Vermehrte Aktivierung von Endothelzellen und Monozyten ist die Folge. Auch die Wandadhärenz der Monozyten am 4. postoperativen Tag (Abb. 1) kann durch Wechselwirkung mit T-Zellen erklärt werden. Fyfe et al. konnten in *in vitro*-Experimenten zeigen, dass allospezifische, aktivierte CD 4^+ T-Helferzellen die monozytäre Adhäsion an kultivierte Endothelzellen fördern (52).

Nach der klassischen Vorstellung erfolgt die Aktivierung $CD8^+$ T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen unter Beteiligung von APCs und aktivierten T-Helferzellen. Pober et al. konnten *in vitro* zeigen, dass jedoch auch Endothelzellen über alle nötigen Signale verfügen, um $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren (9, 26, 27). Durch Endothelzellen aktivierte $CD8^+$ T-Zellen proliferieren wesentlich schwächer, als durch B-Zellen stimulierte $CD8^+$ T-Zellen und weisen eine geringere Zytotoxizität auf (28).

Aktivierte $CD8^+$ T-Lymphozyten sind wichtige Effektorzellen während der akuten Abstoßungsreaktion. Dass $CD8^+$ T-Lymphozyten während Abstoßungsprozessen für die Zerstörung des Gefäßendothels allein verantwortlich sind, ist unwahrscheinlich: Um die Rolle von $CD8^+$ T-Zellen für die Transplantatdestruktion bei akuten Abstoßungsprozessen aufzuklären, wurden Depletionsexperimente durchgeführt. Durch Depletion von $CD8^+$ T-Lymphozyten lassen sich Abstoßungen allogener Nierentransplantate weder verhindern, noch abschwächen (13, 57). Andere, nicht lymphozytäre Leukozytenpopulationen müssen im Rahmen akuter Abstoßungsreaktionen organdestruktiv-zytotoxisch wirken.

1.2.3 Die Rolle von Endothelzellen bei der akuten Transplantatabstoßung

Das Endothel ist von größter Bedeutung für alle Abstoßungsformen. Es stellt die Grenzfläche zwischen Empfängerblut und dem Parenchym des Spenderorgans dar. Sowohl nach isogener, als auch nach allogener Nierentransplantation zeigen sich in den ersten beiden Tagen nach Transplantation perivasale Infiltrate aus mononukleären Leukozyten (1.2.1). Diese sind durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden bedingt: Mit der nach Implantation und Gefäßanastomosierung einsetzenden Reperfusion, kommt es zur Entstehung von Sauerstoffradikalen im Transplantat (162). Sie führen zu einer Erhöhung der Kalziumionenkonzentration in Endothelzellen, was Ödembildung, Proteaseaktivierung und die Produktion weiterer Sauerstoffradikale triggert (75, 142). Die Endothelaktivierung fördert die Entzündung im Transplantat und perivasale Infiltrate sind die Folge. Nach allogener Nierentransplantation kommt es zu einer verstärkten Immunantwort des angeborenen Immunsystems: Aktivierte Endothelzellen exprimieren verstärkt Adhärenzmoleküle der Selektinfamilie, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 und fördern die Adhäsion, sowie die Transmigration von Leukozyten in das Parenchym des Transplantates (53, 68). Die Blockade dieser Adhäsion durch neutralisierende Antikörper führt zu geringeren Gefäßschäden des Transplantates (53, 68). Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut wird u.a. durch Chemokine aus aktivierten Endothelzellen gesteuert. Die Bedeutung der Leukozyten-

rekrutierung über Chemokine für die akute und chronische Transplantatabstoßung ist bereits in einigen Mausmodellen und auch beim Menschen belegt (66, 71, 92). Im Rahmen dieser akuten Immunreaktion treten auch die Monozyten mit dem Endothel in Wechselwirkung, was deren Aktivierung weiter fördert: Aktivierte Monozyten exprimieren verstärkt Tumornekrosefaktor(TNF)- α , Interleukin(IL)-1 β und IL-6. Endothelzellen werden durch diese Zytokine aktiviert und weisen eine vermehrte Expression der o.g. Adhäsionsmoleküle und Chemokine auf (164, 167). Im Rahmen der Transplantatabstoßung konnte gezeigt werden, dass die Blockade von IL-1 β oder TNF- α zu verminderter Rekrutierung von Entzündungszellen in allogene Nierentransplantate führt (164, 167). Zusätzlich reagiert aktiviertes Endothel bei akuten Abstoßungsreaktionen mit vermehrter MHC-Klasse-I- und -II-Antigenexpression (125). IFN- γ , vorwiegend aus aktivierten Empfänger-CD4⁺ T-Lymphozyten, gilt als Hauptstimulus für die MHC-Antigenexpression des Endothels (34). Die verstärkte MHC-Expression, sowie die damit einhergehende CD4⁺ T-Zellaktivierung leitet die spezifische Immunantwort ein, die gegen die Alloantigene des Transplantates gerichtet ist. Die Aktivierung der CD4⁺ T-Helferzellen und ihre Wechselwirkung mit Monozyten und Endothelzellen ist bereits unter 1.2.2 beschrieben. Aktivierte alloantigenspezifische CD8⁺ T-Lymphozyten erkennen MHC-Klasse-I-Antigene auf dem Spenderendothel als fremd und führen schließlich zu seiner Zerstörung.

1.2.4 Die Rolle von Monozyten bei der akuten Transplantatabstoßung

Im Tiermodell können die Gefäße von isogenen und allogenen Nierentransplantaten perfundiert und sowohl mobile als auch randständige Leukozyten gewonnen werden. Auf diese Weise können intravasale Leukozyten des Transplantates bei Abstoßungsprozessen *ex vivo* untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der akuten Abstoßung von allogenen Nierentransplantaten zu einer 9fachen Zunahme der intravasalen Leukozyten kommt. Während der akuten Abstoßung allogener transplantierte Nieren machen Monozyten bis zu 73 % der intravasalen Leukozyten aus (59). Die deutliche Größenzunahme auf bis zu 16 μ m im Durchmesser spricht für eine schon intravasale Aktivierung der Monozyten während akuter Abstoßungsreaktionen (59).

Grau et al. analysierten so gewonnene Leukozytenfraktionen aus isogenen und allogenen Nierentransplantaten bzgl. ihrer Zytokin- und Effektormolekülexpression (59). Ihre Ergebnisse deuten auf eine starke Aktivierung der Monozyten hin: Bei akuter Transplantatabstoßung kommt es zu einer Zunahme der Expression von TNF- α -mRNA in intravasalen mono-

nukleären Leukozyten. Durch die hohe Anzahl massiv aktivierter mononukleärer Leukozyten kommt es lokal zu sehr hohen Konzentrationen von IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF- α in den Gefäßen allogener transplanterter Nieren. Diese proinflammatorischen Zytokine sind typische Produkte von Monozyten, die nach Stimulation durch T-Zellen ausgeschüttet werden (59). Sie gelten als klassische Zytokine der angeborenen Immunität (96). TNF- α -mRNA ist mit akuter Transplantatabstoßung von Nieren- und Herztransplantaten assoziiert (1, 95). iNOS ist ein typisches Enzym aktivierter Monozyten/Makrophagen und ist ebenfalls hochreguliert (59). Folge der Expressionssteigerung sind lokal erhöhte NO-Konzentrationen, die zytotoxisch auf alle Zellen der Umgebung wirken (12, 168). Die erhöhte mRNA-Expression von TNF- α und iNOS läßt vermuten, dass Monozyten Endothelien schädigen. Auch die Expression von *tissue factor* (TF) in Monozyten ist nach allogener Nierentransplantation gesteigert (59). Durch die intravasale Expression von TF können aktivierte Monozyten prokoagulatorisch wirken und Gefäßverschlüsse induzieren (103). Dabei scheint es sich um eine auf das Transplantat beschränkte lokale Hochregulation zu handeln, da mononukleäre Leukozyten aus kardialen Blut der Empfänger allogener Nierentransplantate keine veränderte TF-Expression aufweisen (59). Untersuchungen des Phänotyps zeigten, dass durch Perfusion gewonnene Monozyten aus dem allogenen Nierentransplantat auf ihrer Oberfläche ein Proteinmuster exprimieren, das für einen hohen Aktivierungsgrad spricht. Sie exprimieren nur noch wenig CD4, CD11a, CD18 und CD43, weisen aber eine gesteigerte Expression von L-Selektin (CD62-L), Transferrinrezeptor (CD71) und dem für NK-Zellen typischen Marker CD161 (=NKR-P1) auf (59). Während Monozyten aus unbehandelten LEW-Kontrollnieren nur zu 5 % MHC II⁺ sind, zeigen nach allogener Nierentransplantation 50 % der Monozyten diesen Phänotyp (59).

In *in vitro*-Zytotoxizitätsassays wurde gezeigt, dass Monozyten aus den Gefäßen eines allogenen Nierentransplantates eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität aufweisen (147). José et al. konnten zeigen, dass im akuten Abstoßungsmodell eine spezifische Makrophagendepletion zu verzögerter Transplantatabstoßung führt (81). Nach Jo et al. ließ sich durch Makrophagendepletion auch der renale Ischämie-Reperfusionsschaden vermindern (79). Die Makrophagendepletion gelang beiden Gruppen mit in Liposomen verkapseltem Dichloromethylen-Diphosphonat (159). Sowohl die Destruktion des Parenchyms, als auch die des Endothels im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens waren deutlich vermindert. Jo und José führen die Organprotektion auf die Depletion der Makrophagen zurück. Zu beachten ist, dass dieser Art der Makrophagendepletion immer eine Monozytendepletion voraus geht. Jo betont, dass schon 24 h nach Applikation der Liposomen die Zahl der Monozyten im Blut von 6.2 % auf

0,7 % absank. Ob der Schutz des Transplantates auch durch die Depletion aktivierter Monozyten bedingt sein kann, bleibt zu diskutieren.

Die besondere Rolle des Gefäßkompartimentes und der dort aktivierten Monozyten für die akute Transplantatabstoßung führt zu der Frage, wie diese intravasale Monozytenaktivierung reguliert wird und ob sie pharmakotherapeutisch inhibiert werden kann. Der Mediator Azetylcholin (ACh) könnte hier von Bedeutung sein.

1.3 Der Azetylcholin (ACh)-Syntheseapparat

1.3.1 Cholinazetyltransferase (ChAT)

ChAT ist das Schlüsselenzym der ACh-Synthese. Der cholinerge Genlocus besteht neben der für ChAT-kodierenden Region auch aus der Genregion, die für den vesikulären ACh-Transporter (VACHT) kodiert, und weist einige Besonderheiten auf. Wie Abb. 2 zeigt, sind dem 1. kodierenden Exon von ChAT 3 Exons vorgeschaltet, das R-, N- und M-Exon. Verschiedene ChAT mRNAs sind beschrieben (sog. R-, N-, M-Typen), die durch alternatives Spleißen hervorgehen (Abb. 2) (88, 107, 173). In den meisten peripheren Geweben wird ausschließlich die M-Variante von ChAT exprimiert. Misawa et al. (108) konnten zeigen, dass ChAT und VACHT koreguliert werden. Die VACHT-kodierende Region ist zwischen dem R- und dem N-Exon der cholinergen Genregion lokalisiert, was diese Koregulation erklärt.

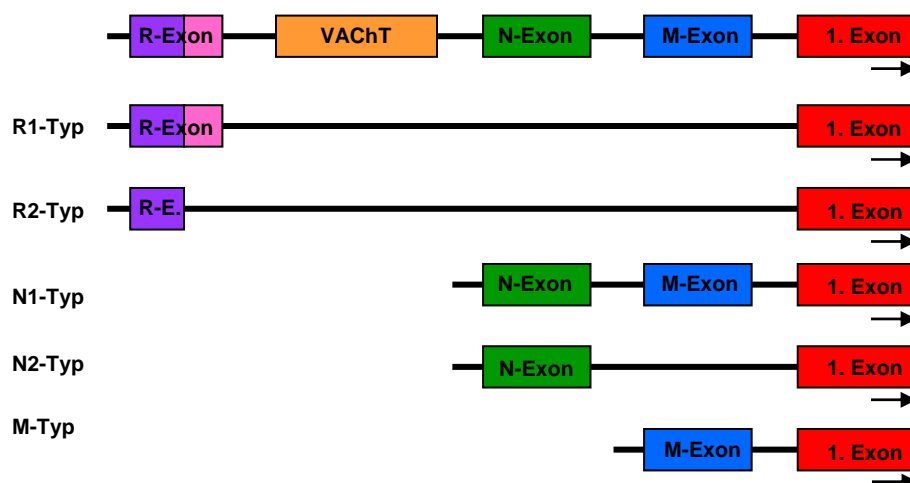


Abb. 2: Schematische Darstellung der nicht kodierenden Region des „cholinergen Genlocus“ der Ratte. Dem 1. Exon der ChAT-kodierenden Sequenz sind drei Exone vorgeschaltet (R-, N- und M-Exon). Als weitere Besonderheit schließt die Region zwischen dem R- und dem N-Exon das komplette VACHT-Gen ein. [R-E. =R-Exon] (nach (94))

Der immunhistochemische Nachweis von ChAT (E.C. 2.3.1.6) gilt als eine Standardmethode zur Darstellung cholinergischer Neurone (89, 90). Mit Antikörpern gegen die ChAT zentraler

Neurone (*cChAT*=*common ChAT*) war der Nachweis in vielen peripheren Neuronen nicht möglich, obwohl diese mit anderen Techniken bereits als cholinerg identifiziert worden waren. Weitere Untersuchungen führten schließlich zur Klonierung einer Spleißvariante von ChAT (153), die für periphere cholinerge Neurone charakteristisch ist (*pChAT*=*peripheral ChAT*).

Durch alternatives Spleißen werden die Exone 6-9 bei pChAT entfernt. Wie Abb. 3 zeigt, werden dabei die Exone 3 (Cholininteraktionsstelle: EELDLPKLPVPPLQ) (44) und 10 (katalytische Domäne: RRLRWKC) (76) erhalten, sodass auch für pChAT eine enzymatische Funktion vermutet wird. Eine Abschwächung der katalytischen Aktivität von pChAT gegenüber cChAT ist denkbar, weil die von den Exonen 8 und 9 kodierten Histidine verlorengegangen sind. Diese könnten an der katalytischen Funktion beteiligt sein (5, 15).

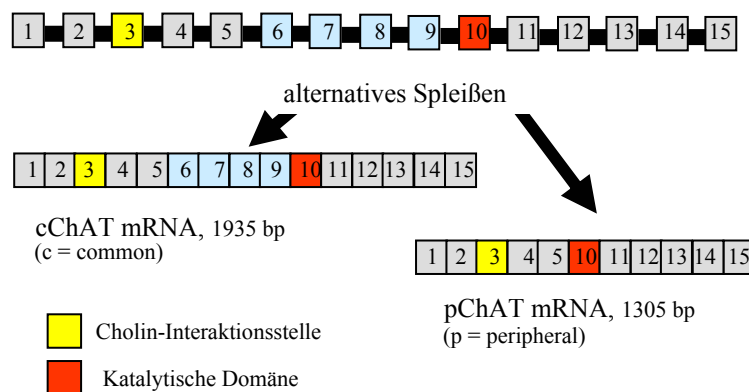


Abb. 3: Schematische Darstellung der ChAT-kodierenden Genregion und der beiden Spleißvarianten cChAT und pChAT. Die Abb. zeigt, dass beide Varianten die bis jetzt bekannten für die Enzymfunktion essenziellen Regionen enthalten: Die Cholin-Interaktionsstelle (Exon 3) und die katalytische Domäne (Exon 10). Für beide Varianten wird deshalb eine enzymatische Funktion postuliert. (nach (94))

Die Promotorregion des humanen ChAT-Gens enthält keine TATA-Box, sondern GC-reiche Regionen. Diese sind charakteristisch für Haushaltsgene, was zum weitverbreiteten Vorkommen von ChAT passt (74). ChAT wurde erstmals 1943 von Nachmansohn und Machado nachgewiesen (109). Die wesentliche Funktion der ChAT ist die Synthese von ACh aus 2 Substraten: Cholin gelangt über den Cholintransporter (CHT1) von extrazellulär in die Zelle oder wird alternativ aus Membranphospholipiden synthetisiert. Azetyl-CoA spielt eine Schlüsselrolle in verschiedenen Stoffwechselwegen (Zitratzyklus, Cholesterinsynthese usw.). Beide Substrate liegen im Überschuss vor. ChAT ist sehr spezifisch für Cholin, aber nicht für das zweite Substrat, den aktivierten Alkyl-Donor (Azetyl-CoA, Propionyl-CoA, Butyryl-CoA) (135). Zunächst dachte man, dass sowohl cChAT als auch pChAT ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert sind. In neusten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich

beide Isoenzyme in ihren intrazellulären Transportwegen unterscheiden: Während pChAT im Zytoplasma, aber nicht im Nukleus detektierbar war, konnte cChAT sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern nachgewiesen werden (105). Durch Hemmung des nukleären Exportes mit Leptomycin B wurde auch pChAT intranukleär nachweisbar (105). Funktionelle Unterschiede zwischen beiden Isoenzymen sind bis heute unbekannt.

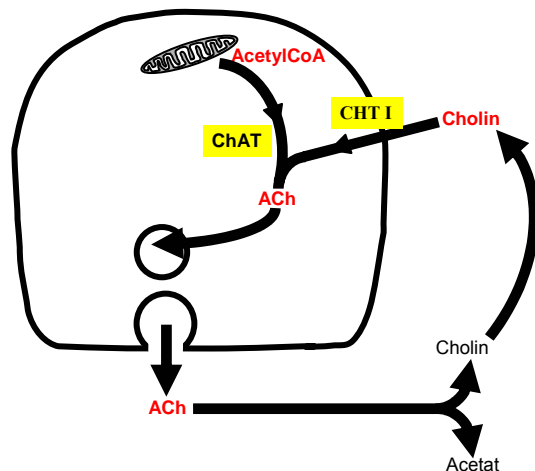


Abb. 4: ACh-Synthese und -Abbau. Cholin gelangt über CHT1 in die Zelle. ChAT synthetisiert ACh aus Cholin und mitochondrialem Acetyl-CoA. Ob auch in peripheren Zellen ACh via Exozytose sezerniert wird, ist umstritten. (nach (94))

Aus dem neuronalen cholinergen System sind bis heute einige Regulationsmechanismen für ChAT bekannt, die im Folgenden erläutert werden sollen. Ob diese auch auf non-neuronale cholinerge Zellen übertragen werden können, ist nicht sicher:

Auf mRNA-Ebene kommt es zu einer Ko-Regulation von ChAT und VAcHT (s.o.). Durch Dibutyryl-cAMP (dbcAMP), ein zyklisches Adenosinmonophosphat(cAMP)-Derivat, lässt sich die mRNA-Expression beider Proteine induzieren (6, 11, 17). Gesteigerte ChAT-Aktivität ist die Folge. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) Typ II konnte als eine Schlüsselstelle in der Signalkaskade identifiziert werden, deren Aktivierung zu gesteigerter ChAT-mRNA Expression führt (11, 140). Neben PKA scheint auch Proteinkinase C (PKC) Einfluss auf die ChAT-Transkription zu nehmen. So führt Arachidonsäure über einen PKC-abhängigen Mechanismus zu vermehrter ChAT-mRNA-Expression (19, 33). Als Teil von Phospholipiden der Zellmembran wird Arachidonsäure durch Calciuminflux oder über G-Protein-abhängige Mechanismen freigesetzt.

Nerve growth factor (128) und *ciliary neurotrophic factor* (6, 8, 106) induzieren ebenfalls ChAT auf Transkriptionsebene. Durch *ciliary neurotrophic factor* gesteigerte mRNA-Expression konnte *in vitro* durch Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) gehemmt werden (106). Die Rolle von MAPK wird z. Zt. noch kontrovers diskutiert, weil andere Experimente die MAPK als wichtigen Stimulus für die ChAT-Promotoren identifizierten (37). Retinsäure und Glukokortikoide (6, 7, 118, 119) führen über ihre intrazellulären Hormonrezeptoren als

Transkriptionsfaktoren am cholinergen Genlokus zu verstärkter ChAT-mRNA-Expression. Mit Dexamethason ließ sich eine deutlich stärkere Hochregulation der Transkription erreichen, als mit Retinsäure. Die Effekte von beiden Hormonen sind zelltyp-spezifisch (7). Interessanterweise lies sich in *in vitro*-Experimenten die durch Dexamethason gesteigerte ChAT- und VAcHT-mRNA-Expression durch dbcAMP verstärken. Weitere Regulatoren wie *bone morphogeneic protein* (BMP) aus der *transforming growth factor*- β (TGF- β)-Superfamilie greifen ebenfalls auf Ebene der Transkription in die ChAT-Expression ein und haben verschieden starke Effekte, die noch weiter erforscht werden müssen (102).

Neben Regulationen auf Transkriptionsebene, kann auch *posttranslational* die Aktivität von ChAT gesteuert werden: Die posttranslationale Phosphorylierung konnte als wichtiger Regulationsmechanismus der ChAT-Aktivität identifiziert werden (33, 37, 173): Sowohl die Menge membrangebundenen ChAT-Proteins (s.u.) als auch die ACh-Synthese werden durch Inhibitoren von Serin/Threonin-Phosphatase (24, 77) und Aktivierung von PKC (54) gesteigert. Offensichtlich ist bzgl. dieser Regulation zwischen einer 69 kDa- und 82 kDa-Form von ChAT zu unterscheiden. Während erstere Substrat für PKC und viele weitere Proteinkinasen ist, nicht aber durch PKA modifiziert wird, wird die 82 kDa-Form nur von PKC und der α -Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen-Proteinkinase phosphoryliert (32). Auch in extraneuronalen Zellen stellt die Phosphorylierung von ChAT einen wichtigen Regulator der Enzymaktivität dar (63).

Durch posttranslationale Phosphorylierung kann auch die Lokalisation des ChAT-Proteins in der Zelle reguliert werden (33): Wie bereits erwähnt, liegt der Großteil von ChAT als lösliches Protein im Zytoplasma vor. Von cholinergen Neuronen ist bekannt, dass ChAT außerdem an die Zellmembran assoziiert vorliegen kann (4, 35). Die Phosphorylierung von ChAT an Position Serin 440 verleiht dem Protein negative Ladung und ändert seine Bindungseigenschaften an subzelluläre Kompartimente (31). In einer Modellvorstellung könnte die Phosphorylierung zu erhöhter Affinität von ChAT an die Zellmembran führen. CHT1 und ChAT stünden dann in engem räumlichen Kontakt und könnten effektivere ACh-Synthese betreiben.

Diese vielfältigen Regulationsmöglichkeiten der ChAT-Expression, -Aktivität und -Verteilung innerhalb der Zelle haben dazu geführt, dass einige Gruppen davon ausgehen, dass die Enzymaktivität von ChAT die Geschwindigkeit der ACh-Synthese bedingt (126, 138, 150).

1.3.2 Der hochaffine Cholintransporter 1 (CHT1)

Cholin wird aus dem Extrazellulärraum mittels des hochaffinen Na^+ -abhängigen Cholintransporters CHT1 in die Zelle aufgenommen (10). In Neuronen gilt die Cholinaufnahme durch CHT1 als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der ACh-Synthese (64, 93). Cholin und sein Transport in die Zelle sind neben der ACh-Synthese für viele Stoffwechselwege von Bedeutung. Dennoch korreliert die CHT1-Dichte in der Zellmembran mit der Stärke der ACh-Sekretion (42). CHT1 gehört zur SLC 5-Familie mit 8 Mitgliedern (172). Neben der Lokalisation im zentralen Nervensystem (ZNS) konnte CHT1 auch in non-neuronalen Zellen wie Keratinozyten (62) und zilienträgenden Zellen des respiratorischen Epithels (122) nachgewiesen werden. Auch die Intima und Media arterieller Gefäße in der Ratte konnten als CHT1^+ identifiziert werden (98).

Das CHT1-Gen der Ratte ist auf Chromosom 9 lokalisiert und umfasst 9 Exons (~ 25 kb). Das CHT1-Protein weist 13 Transmembrandomänen auf mit einem extrazellulären N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus.

Drei wesentliche Regulationsmechanismen für den Cholintransport via CHT1 werden diskutiert:

- 1.) Ferguson et al. beschreiben einen großen intrazellulären CHT1-Pool in Membranen der synaptischen Vesikel neuronaler Zellen. Gesteigerte ACh-Sekretion aus synaptischen Vesikeln cholinergischer Neurone führt automatisch zu erhöhter CHT1-Dichte in der neuronalen Zellmembran. Nach dem Abbau von ACh im synaptischen Spalt durch ACh-Esterase (AChE) kann das Cholin durch CHT1 wieder aufgenommen werden. (42).
- 2.) Die CHT1-Dichte in der Zellmembran steigt, wenn die Clathrin-vermittelte Endozytose blockiert ist (158). Interagierende Proteine können entweder CHT1 in der Membran zurückhalten, oder ihn zur Clathrin-vermittelten Endozytose freigeben.
- 3.) Gates et al. zeigten, dass CHT1 phosphoryliert werden kann. Serin- und Threonin-Reste und der C-Terminus des CHT1-Proteins könnten als Phosphorylierungsorte dienen (54). Der Cholintransport in die Zelle wird durch Gabe von Inhibitoren der Proteinphosphatase-2A, wie Calyculin A, vermindert. Behandlung von Zellen mit dem Immunsuppressivum Ciclosporin A, einem Proteinphosphatase-2B-Inhibitor, führt dagegen zu keiner verminderten Cholinaufnahme (77).

Neben CHT1 als hochaffinem Cholintransporter (K_m 1-5 $\mu\text{mol/l}$) sind niedrig affine Cholintransporter ($K_m=10-100 \mu\text{mol/l}$) und *Choline transporter-like proteins* (CTLs) beschrieben.

CTLs weisen eine Affinität auf, deren K_m zwischen der von CHT1 und der von niedrig affinen Cholintransportern liegt (155). Ihre Rolle für das non-neuronale cholinerge System ist unklar.

1.3.3 Die Wirkung von Azetylcholin auf das Immunsystem

1.3.3.1 Proinflammatorische Wirkungen über muskarinische Azetylcholinrezeptoren

Lymphozyten exprimieren wesentliche Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems: Neben ChAT-Aktivität (48) weisen sie nikotinische (nAChR) und muskarinische ACh-Rezeptoren (mAChR) auf ihrer Oberfläche auf (51, 139). Für die mAChR-Subtypen (M2- bis M5-mAChR) ist bekannt, dass ihre Expression auf der Zelloberfläche reguliert ist. Bei Atemwegsüberempfindlichkeit, wie beim allergischen Asthma, kommt es zu verstärkter Expression von M2- und M5-mAChR auf Lymphozyten. Die M4-mAChR-Expression bleibt dagegen unverändert (130). Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung cholinergischer Rezeptoren auf der Oberfläche peripherer Lymphozyten von ihrem Aktivierungsgrad abhängt (43, 129, 151).

Cholinerge Agonisten erhöhen die freie Ca^{++} -Konzentration (97) und die c-fos-Expression (46) in aktivierten T-Lymphozyten. ACh bzw. seine Agonisten können außerdem zu erhöhter IL-2- und IL-2-Rezeptor (IL-2R)-Expression durch Lymphozyten führen und proliferationsfördernd auf Lymphozyten wirken (86, 111, 132).

Von entscheidender Bedeutung für die Abstoßung allogen transplanterter Organe sind zytotoxische $CD8^+$ T-Lymphozyten. $CD8^+$ T-Lymphozyten differenzieren sich nach Stimulation zu zytotoxischen $CD8^+CD69^+$ T-Lymphozyten. *In vitro* führt kurze Stimulation von T-Lymphozyten durch eine APC zu CD69-Expression, jedoch nicht zur Entwicklung lytischer Aktivität. Dafür sind zusätzliche Stimuli erforderlich. Zimring et al. konnten in Zellkulturexperimenten zeigen, dass ACh einen solchen Stimulus darstellt (177). Hohe Dosen von Atropin hemmen über M1-mAChR die Differenzierung von naiven $CD8^+$ T-Lymphozyten zu zytotoxischen $CD8^+$ T-Lymphozyten. $CD8^+$ T-Lymphozyten von M1-mAChR-defizienten Mäusen (45) entwickeln konsequenterweise keine lytische Aktivität. Wenn der M1-mAChR für die T-Zelldifferenzierung mitverantwortlich ist, bleibt zu klären, warum solch hohe (im Vergleich zu neuronal wirksamen Konzentrationen) Atropindosen nötig sind, um eine Differenzierung zu verhindern.

Eine Reihe von Hypothesen werden z.Zt. diskutiert:

- 1.) Die Affinität des M1-mAChR variiert stark zwischen non-neuronalen und neuronalen Zellen (131).
- 2.) Eine Reihe von Mechanismen sind bekannt, die die Affinität des M1-mAChR von T-Lymphozyten zu Atropin modulieren könnten: M1-mAChR-Phosphorylierungen (72), Dimerisierung/Oligomerisierung (69), allosterische Modulation (146) und Interaktionen mit potenziellen G-Protein-regulierenden *receptor activity modulating proteins* (RAMPs) (21).
- 3.) Extrem hohe lokale ACh-Konzentrationen könnten in der Umgebung von T-Zellen erreicht werden. Dann wären hohe Atropindosen nötig, um die große ACh-Menge von seinen Rezeptoren zu verdrängen (14).

Welche der bisher aufgeklärten intrazellulären Signalkaskaden des M1-mAChR für die differenzierende Wirkung verantwortlich ist, ist bisher unklar. Zimring et al. vermuten eine Interaktion zwischen M1-mAChR, TCR und weiteren co-stimulatorischen Rezeptoren auf T-Zellen (177).

1.3.3.2 Antiinflammatorische Wirkungen über nikotinische Azetylcholinrezeptoren

Die antiinflammatorische Wirkung, die nikotinische Agonisten über nACh-Rezeptoren entfalten, ist von klinischer Relevanz. Eine protektive Wirkung von Nikotin ist für Krankheiten wie Colitis ulcerosa (im Gegensatz zu M.Crohn (80)) und rheumatoide Arthritis schon länger bekannt (40). Beide entzündlichen Erkrankungen führen zu einem erhöhten TNF- α -Spiegel, der zu gesteigerten IL-1 und -6-Spiegeln führt. Nikotin senkt den TNF- α -Spiegel *in vivo*. Außerdem führt Nikotin zu einer verminderten IL-2-, TNF- α - und IFN- γ -Ausschüttung aus peripheren mononukleären Zellen bei simultaner Stimulation von CD3 mit Antikörpern. Nach Infektion einer Alveolarmakrophagenzelllinie der Maus mit *Legionella pneumophila* führte eine Nikotininkubation zu einer verminderten Ausschüttung von IL-6, TNF- α und IL-12, jedoch nicht von IL-10. Die bakterielle Zellzahl nahm deutlich zu (104). Für die vorliegende Arbeit ist von Bedeutung, dass IL-10 und IL-12 zwei Schlüsselzytokine für die Regulation des Gleichgewichtes zwischen Th1- und Th2-Zellen darstellen (41, 73, 127). IL-12 fördert die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen und T-Zellen und gilt als Aktivator von Monozyten/Makrophagen. IL-10 entfaltet antagonistische Wirkungen, indem es die IL-12-Ausschüttung durch aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen hemmt. Da Nikotin zu verminderter IL-12-Sekretion aus Makrophagen führt und ihre Immunantwort hemmt, die

IL-10-Sekretion hingegen nicht beeinflusst, kann Nikotin die für die Transplantationsimmunologie bedeutende Th1-Antwort hemmen (104). Nikotin hemmt die Produktion von TNF- α , Prostaglandin E₂ (PGE₂) und *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α durch *in vitro* kultivierte Monozyten/Makrophagen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) (176). Wie erläutert, kommen TNF- α und PGE₂ eine besondere Bedeutung bei systemischen Entzündungsreaktionen zu, während MIP-1 α mit der Akkumulation von Th1-Zellen in Verbindung gebracht wird. Auch CD14 und der LPS-Rezeptor (*toll-like receptor 4*) von Makrophagen werden nach Stimulation über nAChR vermindert exprimiert, genauso wie Zelladhäsionsmoleküle (ICAM 1) und CD40 (65). Takahashi konnte ähnliche Effekte für Makrophagen zeigen, die zuvor mit IL-18 stimuliert worden waren (149). Diese reagieren auf Nikotin mit verminderter ICAM-, B7.2- und CD40-Expression. IL-12, IFN- γ und TNF- α aus peripheren mononukleären Leukozyten waren ebenfalls vermindert.

Für die antiinflammatorischen Effekte von ACh wird von einigen Gruppen der $\alpha 7$ -nAChR verantwortlich gemacht (166). Dieser wird auch von Makrophagen exprimiert. In unserem experimentellen Modell konnte die Expression des nikotinischen $\alpha 7$ -Rezeptors durch intravasale Transplantatleukozyten, die zu über 70 % aus Monozyten bestehen, *in vivo* nicht nachgewiesen werden (70). Zwar gelang es, Monozyten als $\alpha 7$ -nAChR⁺ Zellen *in vitro* zu identifizieren, in Zellkulturexperimenten nehmen Monozyten aber immer makrophagenähnliche Eigenschaften an (176).

1.3.4 Der cholinerge, antiinflammatorische Regelkreis

Die Arbeitsgruppe um Tracey konnte zeigen, dass der Nervus vagus die TNF- α -Ausschüttung von Makrophagen reguliert (14). In der Ratte wurde mit LPS-Gabe ein sepsisähnlicher Zustand erzeugt und gleichzeitig der Nervus vagus stimuliert. Als Kontrolle dienten Ratten, bei denen zwar LPS gegeben wurde, nicht aber die Vagusstimulation erfolgte. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe überlebten die Vagus-stimulierten Tiere die Experimente und wiesen deutlich geringere TNF- α -Spiegel im Serum auf. Die neuronale ACh-Ausschüttung führte zu einer Inhibition der TNF- α -Sekretion aus Makrophagen. Wang et al. blockierten *in vitro* $\alpha 7$ -nAChR auf Makrophagen mit α -Bungarotoxin. Eine antiinflammatorische Wirkung von ACh oder Nikotin war nicht mehr erfassbar (166). Versuche mit $\alpha 7$ -nAChR-defizienten Mäusen bestätigten, dass die antiinflammatorische Wirkung des Nervus vagus über $\alpha 7$ -nAChR vermittelt wird (166). Erfasst das ZNS über IL-1-Rezeptoren auf sensorischen Nervenzellen des

Nervus vagus eine gesteigerte immunologische Aktivität der Makrophagen, steigert es die vagale ACh-Ausschüttung und verhindert eine überschießende inflammatorische Antwort (154, 166).

Der Abbau von ACh erfolgt durch AChE. V.a. Hepatozyten, Muskelfasern und Erythrozyten weisen hohe AChE-Konzentrationen auf (169). Ihre hohe katalytische Aktivität bedingt die sehr kurze Halbwertszeit von sezerniertem ACh, sodass angezweifelt werden kann, ob neuronal sezerniertes ACh Blutleukozyten bzw. gewebsständige Makrophagen erreichen kann. Tracey publizierte kürzlich, dass der cholinerge antiinflammatorische Effekt auf Makrophagen der Milz im Rahmen des cholinergen antiinflammatorischen Regelkreises durch Katecholamin sezernierende Nervenenden des N. splenicus vermittelt wird und nur indirekt durch ACh vermittelt wird (134). Bei kritischer Betrachtung der Hypothese vom cholinergen antiinflammatorischen Regelkreis stellt sich also die Frage, ob neuronales ACh wirklich weitreichende Wirkungen entfalten kann.

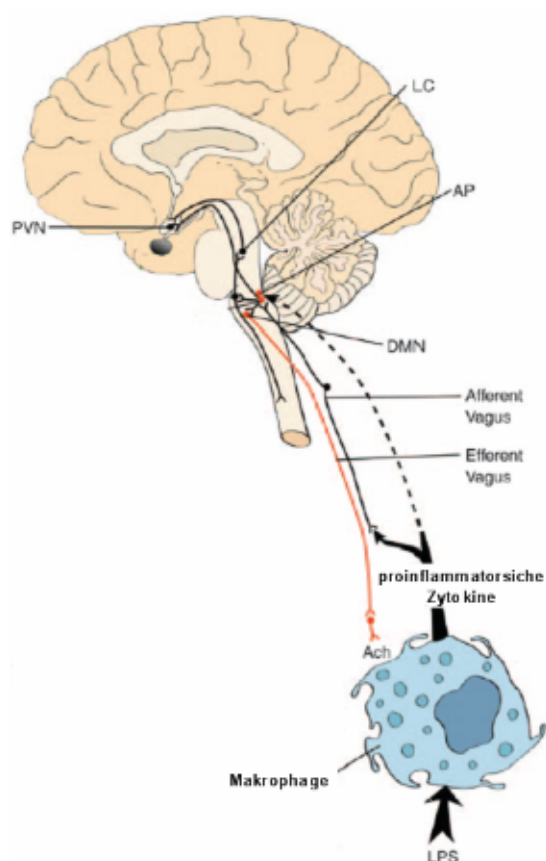


Abb. 5: Schema zum cholinergen, antiinflammatorischen Pfad: ACh führt über den $\alpha 7$ -nAChR zur Inhibition der TNF- α und IL-1-Sekretion von Makrophagen. Über neuronale IL-1-Rezeptoren kann die Aktivität der Makrophagen ermittelt werden. Ist sie im Rahmen von immunologischen Prozessen erhöht, steigt die neuronale ACh-Ausschüttung und damit die Inhibition der sekretorischen Makrophagenaktivität. (nach (117))

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Gefäßkompartiment des allogenen Nierentransplantates kommt es während der akuten Abstoßungsreaktion zu einer massiven Aktivierung und Ansammlung mononukleärer Leukozyten. Ungefähr 70 % dieser Leukozyten sind Monozyten, die vermutlich während der Abstoßung des Transplantates eine zentrale Rolle spielen. ACh könnte die Funktion intravasaler Transplantatleukozyten regulieren.

Als Quellen des Neurotransmitters ACh kommen neben Neuronen auch periphere, non-neuronale Zellen in Frage. Im Gefäßkompartiment des denervierten Transplantates scheiden Neurone als Quelle intravasalen ACh aus, sodass die Funktion des non-neuronalen cholinergen Systems in diesem Modell sehr gut untersucht werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, die intravasalen mononukleären Leukozyten in einer immunologischen Extremsituation, wie der akuten Organabstoßung, auf ihre ChAT und CHT1-Expression hin zu untersuchen. In dieser Arbeit werden Gefäßperfusate isogener (LEW auf LEW) und allogener (DA auf LEW) Nierentransplantate verglichen. Mittels Westernblot und *polymerase chain reaction* (PCR) werden diese Leukozytenpopulationen auf ihren ChAT- und CHT1-Protein- und mRNA-Gehalt hin analysiert. Abschließend wird ACh, als Produkt von ChAT und CHT1, in intravasalen mononukleären Leukozyten gemessen und die allogene mit der isogenen Situation verglichen.

In dieser Arbeit sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

- 1.) Leukozyten in den Blutgefäßen von experimentellen Nierentransplantaten besitzen die enzymatische Ausstattung zur ACh-Synthese (ChAT und CHT1).
- 2.) Die Expression von ChAT und CHT1 wird in Abhängigkeit von der Transplantatabstoßung reguliert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Aceton p.a. (pro analysi) (Merck, Darmstadt; 1.00014.1011)
Acrylamidlösung Rotiphorese 30 % (Roth, Karlsruhe; 3037.1)
Agarose Genagarose LE (Inno-train, Kronberg; GX04090)
Albumin Standard (Pierce, Rockford, USA; 23209)
Ammoniumperoxidisulfat p.a. (Roth, Karlsruhe; 9592.3)
Ampicillin ratiopharm (ratiopharm, Ulm)
Anti-Maus-Immunglobulin (Ig), Peroxidase-gekoppelt, aus dem Kaninchen (Dako-Cytomation, Carpinteria, USA)
Aqua ad injectabilia (Aqua ad inj.) (Baxter, Lessines, USA; 001428)
Aqua destillata (Aqua dest.) (Merck, Darmstadt; 244)
Brillant Blue G (Sigma-Aldrich, Steinheim; B0770-5G)
BSA, Albumin, *bovine, fraction V* (Serva, Heidelberg; 11930)
Chloralhydrat (Merck, Darmstadt; 2425)
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) (Roche, Mannheim; 1277049)
Dimethylformamid (Merck, Darmstadt; 1.03053)
Dinatriumhydrogenphosphat p.a. (Merck, Darmstadt; 1.06580.1000)
Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen, Karlsruhe; 495714)
DNase (Invitrogen, Karlsruhe; 486136)
DNase Puffer (Invitrogen, Karlsruhe; 464785)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-Disodium p.a. (Serva, Heidelberg; 11280)
EDTA, 25 mM (Invitrogen, Karlsruhe; 391301)
EnVision+[®]System Labelled Polymer-*alkaline phosphatase*(AP) *anti-rabbit/mouse* (DakoCytomation, Carpinteria, USA)
EnVision+[®]System Labelled Polymer-*horseradish peroxidase*(HRP) *anti-rabbit* (DakoCytomation, Carpinteria, USA)
Essigsäure 100 %, Eisessig p.a. (Merck, Darmstadt; 64271)
Essigsäure 96 % p.a. (Sigma Aldrich, Seelze; 33206)
Ethanol p.a. (Sigma-Aldrich, Seelze; 25690)
Ethidiumbromid 1 % (Roth, Karlsruhe; 2218.1)
Fast Blue BB Salt (Sigma-Aldrich, Steinheim; F-3378)
Fast Red (Sigma-Aldrich, Steinheim; F-1630)
First strand buffer (Invitrogen, Karlsruhe; 494157)
Glycergel *mounting medium* (DakoCytomation, Carpinteria, USA; C0563)
Glyzerin (Sigma-Aldrich, Steinheim; G-2025)
Glyzin p.a. (Roth, Karlsruhe; 3908.2)
Hämatoxylin (Merck, Darmstadt; 15938)
Heparin ratiopharm 25 000 IE/5 ml (ratiopharm, Ulm)
Isopropanol p.a. (Baker, Griesheim; 8067)
Kalialaun (Merck, Darmstadt; 1042)
Kaliumchlorid p.a. (Merck, Darmstadt; 4936)
Kaliumdihydrogenphosphat p.a. (Merck, Darmstadt; 1.04873.0250)
Levamisol, Tetramisolhydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim; 31742)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim; M6250)
Methanol 99,8 % (Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz; 65543)
Milchpulver *blotting grade* (Roth, Karlsruhe; T145.3)
Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA; 23235)
Molekulargewichtsstandard, 100 bp *DNA ladder* (Promega, Madison, USA; 18149204)
Naphthol AS-MX-Phosphate (Sigma-Aldrich, Steinheim; N-4875)
Narcoren, Pentobarbital-Na (Merial, Hallbergmoos)
Natriumazid, NaN_3 reinst. (Merck, Darmstadt; 1.06688.0100)
Natriumchlorid, NaCl p.a. (Roth, Karlsruhe; 3957.1)
Natriumdihydrogensulfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ reinst (Merck, Darmstadt; 1.06345.1000)
Natriumhydrogensulfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck, Darmstadt; 1.06580.1000)
Natriumhydroxid, NaOH 1 mol/l (Merck, Darmstadt; 1.09137.1000)
Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecylsulfate* (SDS), ultrapure $\geq 99,9\%$ (Carl Roth, Karlsruhe; 2326.2)
Natriumhypochlorit, Chlorbleiche (Merck, Darmstadt; 1.05614.2500)
Natriumjodat, NaJO_3 p.a. (Merck; 1.06525.0100)
Normalrattenserum (Harlan-Winkelmann, Borcheln)
Oligo-DTs (MWG Biotech, Ebersberg)
Orange G to dye (Sigma-Aldrich, Steinheim; O1625)
Paraffin, Gewebereinbettmittel (Vogel, Gießen, VO-5-1001)
Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim; P6148-IKJ)
Percoll (GE Healthcare Bio Sciences, Uppsala, Schweden; 17-0891-01)
Pertex (Medite, Burgdorf; PER30000)
Protease (Sigma-Aldrich, Steinheim; P-5147)
Protease-Inhibitortablette, Complete® Mini (Roche Diagnostics, Mannheim; 1836153)
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden; 28704)
Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham Biosciences Europe, Freiberg; RPN800)
Rneasy Mini Kit (Quiagen, Hilden; 74104)
Rotiblock, 10x-Konzentrat (Roth, Karlsruhe; A151.1)
Rotihistol (Roth, Karlsruhe; 6640.1)
Salzsäure, HCl 1N (Merck, Darmstadt; 1.09057.1000)
Silan, 3-Aminopropyltriethoxysilan 98 % (Sigma-Aldrich, Steinheim)
SuperScript™ II, *reverse transcriptase* (Invitrogen, Karlsruhe; 18064-022)
SuperSignal® WestPico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA; 34080)
TEMED p.a. (Roth, Karlsruhe; 2367.3)
Thermostabile DNA-Polymerase, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, USA; 4338856)
Tris Base 99,9 % (Sigma-Chemical, St.Louis, USA; T-1503-1)
Tris HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim; T-3253)
Tween 20 p.a. (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn; 8.22184.0500)
UHU-Alleskleber (Uhu, Bühl)
voll-entsalztes (VE)-Wasser (Universitätsklinikum Gießen)
Wasserstoffperoxid, H_2O_2 30 % (Merck, Darmstadt; 1.07209.1000)
Xylol reinst (Merck, Darmstadt; 1.08685.2500)
Zitronensäure-Monohydrat p.a. (Merck, Darmstadt; 1.0024.0500)

2.1.2 Geräte und Kleinmaterial

AlphaEase FC software 3.3.0 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA)
 Amersham HyperfilmTMECL *high performance chemiluminescence film* (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, Großbritannien)
 Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hanau)
 Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden)
 Blotting-Apparatur (Keutz Labortechnik, Reiskirchen)
 Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)
 Eppendorf Zentrifuge (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg; 5417R)
 MasterCycler (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)
 Mikroskop Olympus BX511F (Olympus, Japan)
 Digitalkamera CC12 (Soft imaging system GmbH, Münster)
 Mikrotom Microm cool-cut HM355S (Microm GmbH, Walldorf)
 Plattenspektralphotometer FLUOstar OPTIMA (BMG Labtechnologies)
 SpeedVac[®] Plus mit Savant Universal Vacuum System Plus (GMI, Minnesota, USA)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind im Folgenden aufgeführt:

Lösung/Puffer	Herstellung
Ammoniumperoxidisulfat-Lösung	2 g Ammoniumperoxidisulfat wurden in 8 ml VE-Wasser gelöst.
„Coomassie“-Entfärber	Zur Herstellung des Entfärbers wurden gemischt: <ul style="list-style-type: none"> • 350 ml Methanol • 24,5 ml Essigsäure • 325,5 ml Aqua ad inj.
„Coomassie“-Farblösung	Gemischt wurden: <ul style="list-style-type: none"> • 200 ml „Coomassie“-Entfärber (s.o.) • 50 mg <i>Brillant Blue</i>
Hämalaunfärbelösung	1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat und 50 g Kalialaun wurden in 1000 ml VE-Wasser gelöst. Der Lösung wurden am nächsten Tag 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure zugegeben. Nach 5 min Erhitzen unter Rühren wurde die Lösung filtriert. In dieser Arbeit wurde die Farbstofflösung vor Gebrauch 1:10 mit VE-Wasser verdünnt.

Laufpuffer	<p>Zu 100 ml 10 %iger SDS-Stammlösung wurden gegeben:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 30,4 g Tris Base • 144,2 g Glyzin <p>Anschließend wurde mit Aqua ad inj. auf 10 l aufgefüllt.</p>
Naphtol AS-MX-Phosphat-Puffer mit 1mM Levamisol	<p>In 200 µl Dimethylformamid wurden 2 mg Naphtol AS-MX-Phosphat gelöst. Anschließend wurden 9,8 ml 0,1 M Tris HCl (0,1 M, pH 8,2) und 2,4 mg Levamisol zugegeben.</p>
Orange G-Gebrauchslösung	<p>Gemischt wurden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5,12 ml 100 % Glyzerin (= 50 %) • 500 µl 1 M Tris HCl (pH 8) • 1 ml 0,5 M EDTA-Lösung <p>Anschließend wurde mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt und 0,1 ml Orange G to dye zugegeben. Zuletzt wurde die Lösung steril filtriert, aliquotiert (à 500 µl) und bei -20 °C eingefroren.</p>
Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (4 %)	<p>4 g PFA wurden bei 60 °C in 50 ml VE-Wasser gelöst. Dabei wurden 2 Tropfen (= ca. 75 µl) NaOH (1 M) zugegeben. Wenn die Lösung klar geworden war, wurden 50 ml 2 x konzentrierter Sørensen-Puffer zugesetzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde der pH mit Indikatorpapier überprüft (pH 7,4).</p>
PBS/BSA/Azid	<p>In 20 ml PBS wurden gelöst:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,2 g BSA • 0,02 g NaN₃
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS) (1x)-Gebrauchslösung	<p>Die Stammlösung wurde 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und auf pH 7,2 eingestellt.</p>
PBS (10x) Stammlösung	<p>In 1 l VE-Wasser wurden gelöst:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 80 g NaCl (1,37 M) • 2 g KCl (27 mM)

	<ul style="list-style-type: none"> • 2 g KH_2PO_4 (15 mM) • 14,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (80 mM)
Percolllösung	<p>Für 2 Ansätze à 14 ml wurden gemischt:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8,8 ml H_2O • 2,8 ml 1,5 M NaCl • 16,4 ml Percoll • 60 µl 1 M HCl
Peroxidasesubstratlösung	<p>1 Tablette (1 mg 3,3-Diaminobenzidin (DAB)) wurde in 20 ml TBS gelöst. 1 ml Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren.</p> <p>Vor Gebrauch:</p> <p>10 µl einer 1,2 %igen Wasserstoffperoxidlösung wurden zu 1 ml DAB-Lösung gegeben, so dass sich ein Endkonzentration von 0,012 % Wasserstoffperoxid ergab.</p>
Probenpuffer (vollständig)	<p>Gemischt wurden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,625 ml 1 M Tris HCl (pH 6,8) • 1 ml Glyzerin • 2,3 ml 10 %ige SDS-Stammlösung • 0,4 ml 2-Mercaptoethanol • 5,675 ml Aqua ad inj. <p>Zusätzlich wurde eine Protease-Inhibitortablette zugegeben.</p>
Probenpuffer I	<p>In Probenpuffer I erfolgte die Proteinbestimmung (siehe 2.2.3.1). Er enthielt im Gegensatz zum o.g. Probenpuffer weder 2-Mercaptoethanol, noch Glyzerin. Vor der Gelelektrophorese wurde Probenpuffer II zugegeben, der 2-Mercaptoethanol und Glyzerin enthielt.</p> <p>Gemischt wurden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,625 ml Tris HCl (pH 6,8) • 2,3 ml SDS (10 %) • 7,075 ml Aqua ad inj. • 1 Protease-Inhibitortablette

Probenpuffer II	<p>Er enthielt Glycerin und 2-Mercaptoethanol. Gemischt wurden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,625 ml Tris HCl (pH 6,8) • 4 ml Glycerin • 2,3 ml SDS (10 %) • 1,6 ml 2-Mercaptoethanol • 1,475 ml Aqua ad inj. • 1 Protease-Inhibitortablette <p>Dieser Puffer wurde nach der Proteinbestimmung zugegeben. Es galt:</p> <p>3 x Probenpuffer I + 1x Probenpuffer II = Probenpuffer</p>
Proteaselösung	Pro eingewogenes mg Protease wurden 2 ml <i>Tris buffered saline</i> (TBS) zugegeben.
Sammelgelpuffer	6,06 g Tris Base wurden in 70 ml Aqua ad inj. gelöst und mit 1 n HCl auf pH 6,8 eingestellt. 4 ml 10 %ige SDS-Stammlösung wurden dazugegeben, bevor mit Aqua ad inj. auf 100 ml aufgefüllt wurde.
Sørensen-Puffer (2x)	<p>In 500 ml VE-Wasser wurden gelöst:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3,08 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ • 14,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Substratlösung der alkalischen Phosphatase	<p>Gemischt wurden :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 mg Fast Blue BB resp. 1 mg Fast Red in • 1 ml Naphtol AS-MX-Phosphat-Puffer mit 1mM Levamisol
SDS-Stammlösung (10 %)	10 g Natriumdodecyl-Sulfat (SDS, <i>Sodiumdodecylsulfate</i>) wurden in 100 ml VE-Wasser gelöst.
Stripping-Puffer	31,2 ml Tris HCl-Lösung (1 M, pH 6,8) und 3,47 ml 2-Mercaptoethanol wurden zu 100 ml SDS-Lösung (10 %) gegeben.

TAE-Lösung 50x	In 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M) (pH 8), wurden 242 g Tris Base gelöst und 57,1 ml Essigsäure zugegeben. Zuletzt wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.
TBS	6,05 g (50 mmol) Tris Base und 9 g (154 mmol) NaCl wurden in 900 ml VE-Wasser gelöst. Es wurde auf pH 7,6 eingestellt (ca. 5 ml 5 % HCl) und mit VE-Wasser auf 1 l aufgefüllt.
Trenngelpuffer	18,16 g Tris Base, in 70 ml Aqua ad inj. gelöst, wurden mit 1 n HCl auf pH 8,8 eingestellt. Nach Zugabe von 4 ml 10 %iger SDS-Stammlösung wurde auf 100 ml aufgefüllt, so dass sich eine 15 M Tris-Lösung ergab.
0,1 M Tris HCl-Puffer (pH 8,2)	12,1 g Tris Base wurden in 800 ml VE-Wasser gelöst und mit 1 n HCl auf pH 8,2 eingestellt. Dann wurde auf 1 l aufgefüllt.
1 M Tris HCl-Puffer (pH 6,8)	1,576 g Tris HCl wurden in 10 ml VE-Wasser gelöst und mit ca. 800 µl 1 n NaOH auf pH 6,8 eingestellt.
Zitratpuffer	2,1 g Zitronensäure-Monohydrat (0,01 M) wurden in 900 ml VE-Wasser gelöst und mit NaOH-Lösung auf pH 6,0 eingestellt. Anschließend wurde mit VE-Wasser auf 1 l Lösung aufgefüllt.

2.2 Methoden

2.2.1 Transplantation

2.2.1.1 Versuchstiere

Männliche LEW- und DA-Ratten der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) und des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover (Deutschland) dienten als Versuchstiere. Sowohl die Versorgung der Tiere, als auch die Experimente wurden nach dem Deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien des *National Institute of Health (NIH)* durchgeführt. Für die Nierentransplantation mussten die Tiere ein Gewicht von 250-300 g aufweisen.

Für die allogenen Nierentransplantationen wurden DA-Nieren in LEW-Ratten implantiert. Die isogenen Transplantationen von LEW-Nieren in LEW-Ratten dienten als Kontrollgruppe. Weiterhin wurden Nieren unbehandelter LEW-Ratten als Kontrollen verwendet.

2.2.1.2 Transplantation von Rattennieren

Die Nierentransplantationen wurden im Wesentlichen nach der von Fabre et al. etablierten Methode freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Grau durchgeführt (38).

Sowohl die Transplantatspender (LEW oder DA), als auch die Empfänger (LEW) erhielten präoperativ 1,1 µl Nembutal pro g Körpergewicht (entsprechend 66 µg Pentobarbital). Das Narkotikum wurde intraperitoneal appliziert. Die Spender wurden zusätzlich heparinisiert. Im 1. Schritt erfolgte die Entnahme der linken Niere des Empfängers. Die linke Niere des heparinisierten Spenders wurde orthotop implantiert. Es erfolgte schrittweise die End-zu-End-Anastomose der Blutgefäße mit je neun Stichen Ethilon 10-0. Zur Reduktion der warmen Ischämiezeit (stets < 30 min) wurde der Blutfluß wieder hergestellt, bevor die Ureteranastomose mit vier Stichen Ethilon 11-0 durchgeführt wurde. Vor der kontralateralen Nephrektomie des Empfängers erfolgte die Ligation der Nierenarterie und -vene sowie des Ureters mit Handseide 6-0.

Um postoperativen Infekten vorzubeugen, erhielten die frisch transplantierten Tiere 300 µl Ampicillin intraperitoneal. Auf eine immunsuppressive Behandlung wurde verzichtet.

2.2.1.3 Organperfusion

Die Perfusion des Gefäßsystems des Transplantates erfolgte am 4. Tag post operationem. Die Tiere wurden betäubt und heparinisiert. Die Perfusion der Niere wurde mit 100 ml eiskaltem calcium- und magnesiumfreiem PBS durchgeführt, das zusätzlich EDTA (27 mM) und 0,1 % BSA enthielt (59). Die Applikation dieser Lösung erfolgte durch die Aorta. Das Perfusat wurde mittels eines Katheters in der Vena cava inferior auf Eis aufgefangen.

2.2.1.4 Zellaufreinigung

Das Perfusat wurde bei 500 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml (isogenes Nierentransplantat) bzw. 10 ml (allogenes Nierentransplantat) PBS/BSA resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (59).

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellen mit 25 ml (isogenes Nierentransplantat) bzw. 100 ml (allogenes Nierentransplantat) PBS vermischt. 25 ml Lösung wurden auf

jeweils einen Percollgradienten (Dichte 1,082) aufgetragen und für 30 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Für Zellen aus isogenen Nierentransplantaten wurden ein, für Zellen aus allogenen Nierentransplantaten 4 Gradienten à 14 ml verwendet. Die Zellen der Interphase wurden in 50 ml PBS aufgenommen und 15 min zentrifugiert (500 g, 4 °C). Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen des entstandenen *pellets* in PBS, dem 0,1 % BSA zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.2.1.5 Fixierung

Nach der Organentnahme wurden die Nieren mit einer Klinge so querschnitten, dass die ca. 3 mm dicken Scheiben sowohl Pelvis renalis, als auch Hilum der Niere mit umfassten. Für 24 h wurden die Objekte in frisch dissoziiertem, gepuffertem Paraformaldehyd (4 % in Sørensenpuffer) fixiert. Danach wurden sie für 1 Tag in Sørensenpuffer (1x) gewaschen. Am Tag 3 wurden die Gewebestücke für 30 min in 50 %igem Isopropanol, danach dreimal in 70 %igem Isopropanol belassen.

2.2.1.6 Einbettung der Nierentransplantate

Nach der Fixierung wurden die Präparate in eine Einbettkammer geklemmt und für je 1 h bei RT in 96 % Isopropanol und zweimal in 100 % Isopropanol überführt. Unter dem Abzug erfolgte für je 1 h (RT) die Inkubation in 25 % Rotihistol (+ 75 % Isopropanol), 50 % Rotihistol (+ 50 % Isopropanol), 75 % Rotihistol (+ 25 % Isopropanol) und zuletzt in 100 % Rotihistol. Die Präparate wurden danach in 60 °C warmes, geschmolzenes Paraffin überführt, welches nach 2 h gewechselt wurde, und darin ü.N. inkubiert.

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Silanisierung der Objektträger

Die Silanisierung ermöglicht ein besseres Haften der Paraffinschnitte auf den Objektträgern. Sie umfasste die folgenden Schritte:

- 1.) Über Nacht (ü.N.) in 5 % HCl
- 2.) 5 min in VE-Wasser
- 3.) 5 min in 100 % Ethanol
- 4.) 30 min trocknen bei Raumtemperatur (RT)

- 5.) 5 min in 2 % Silan in Aceton
- 6.) ü.N. trocknen bei 42 °C.

2.2.2.2 Anfertigung der Schnitte und Entparaffinierung

Von den in Paraffin eingebetteten Nieren wurden 5 µm dicke Schnitte gefertigt. Je 2 Schnitte wurden pro silanisiertem Objektträger aufgebracht und ü.N. bei 42 °C getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte nach folgendem Schema:

- 1.) 3 x je 10 min in Xylol
- 2.) 2 x je 3 min in 100 % Isopropanol
- 3.) 3 min in 80 % Isopropanol
- 4.) 3 min in 70 % Isopropanol
- 5.) 3 min in 50 % Isopropanol
- 6.) 3 min in VE-Wasser
- 7.) 3 min (bei Bedarf länger) in TBS

2.2.2.3 Einzelfärbungen

In dieser Arbeit wurde das EnVision-System für den immunhistochemischen Nachweis verschiedener Antigene verwendet. Die entsprechenden Antikörper sind in Tab. 1 aufgeführt.

Antikörper	Klonalität	Spezies	Verdünnung	Inkubationsbedingungen
anti-CHT1 (98)	polyklonal	Kaninchen	1:4000	ü.N., 4 °C
anti-cChAT (123)	polyklonal	Kaninchen	1:6000	ü.N., 4 °C
anti-pChAT (123)	polyklonal	Kaninchen	1:8000	ü.N., 4 °C
ED1 (30)	monoklonal	Maus	1:2000	2 h, RT

Tab. 1: Antikörper und Reaktionsbedingungen für die immunhistochemischen Färbungen.

Nach der Entparaffinierung (2.2.2.2) erfolgte die Antigendemaskierung mit 50 µl Proteaselösung (2.1.3). Nach 15 min bei RT wurde die Enzymlösung mit PBS abgespült. Für je 2 min wurden die Objekte in PBS gewaschen. Um endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren, wurden die Schnitte 30 min bei RT in 1 % Wasserstoffperoxidlösung inkubiert (3,3 ml 30 % Wasserstoffperoxid auf 96,7 ml PBS). Wasserstoffperoxid wurde durch dreimaliges Waschen in PBS für je 2 min entfernt. Um ein Zusammenfließen der Lösungen zu verhindern, wurde

jeder Schnitt vorher mit einem hydrophoben UHU-Ring (1 g UHU auf 4 ml Aceton) umkreist. Anschließend wurden je 50 µl PBS/BSA/Azid aufgebracht.

40 µl der Primärantikörperlösung (Antikörper in PBS/BSA/Azid verdünnt) wurden auf den jeweiligen Organschnitt gebracht. Die Inkubationszeiten und -temperaturen variierten je nach verwendetem Antikörper. Sie sind in Tab. 1 aufgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Abspülen mit PBS entfernt. Im Folgenden wurden 40 µl des *EnVision+[®]System Labelled Polymer-HRP* bzw. -AP-Detektionssystems aufgebracht. Dabei handelt es sich um Polymere, die mit anti-Ig-Antikörpern und Peroxidase (HRP) oder alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert sind (siehe Abb. 6).

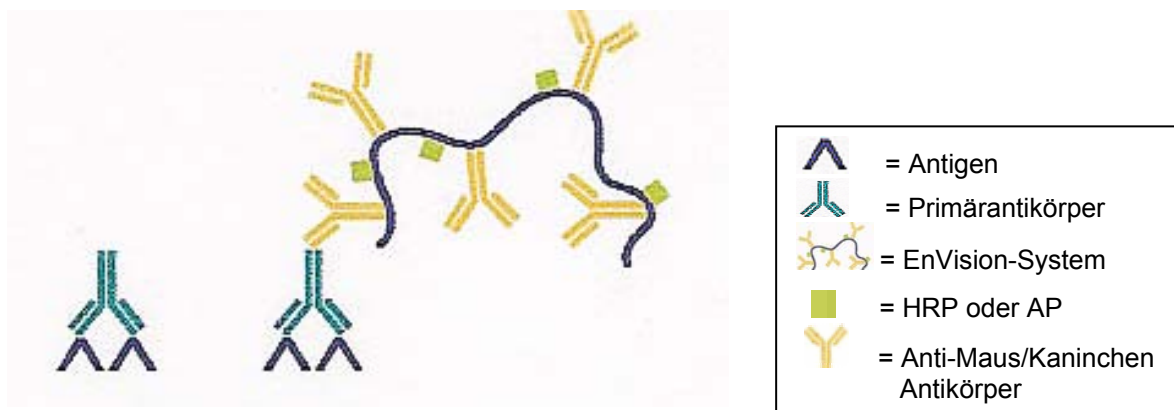


Abb. 6: EnVision-System (Education Guide Immunohistochemical Staining Methods, 4th Edition, Dako Cytomation, S.83, 2006)

Beim Nachweis von Maus-Primärantikörpern ist zu beachten, daß das anti-Maus-Ig-EnVision auch Rattenantikörper des Organschnittes erkennen würde, was durch Zusatz von 5 % Normalrattenserum zu verhindern ist. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT wurde überschüssiges Polymer durch dreimaliges Waschen mit TBS bei HRP-Nachweis oder 0,1 M Tris HCl-Puffer bei Alkalische Phosphatase (AP)-Nachweis entfernt. Zum Nachweis der Peroxidase wurde eine entsprechende Peroxidasesubstratlösung aufgebracht. In den folgenden 10 min Inkubationszeit wurde das Substrat umgesetzt. Es ergab sich eine braune Färbung. Überschüssiges DAB* wurde durch dreimaliges Abspülen der Objektträger mit PBS entfernt.

Zum Nachweis wurde die Fast Blue- oder Fast Red-enthaltende Substratlösung der AP aufgebracht. Je 100 µl Substratlösung wurde auf den Schnitt gegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT und Dunkelheit wurde dreimal mit PBS abgespült. Die Schnitte wurden in eine Küvette mit PBS gestellt.

* Sowohl Pipettenspitzen, DAB-haltige Cups, als auch das zum Abspülen verwendete PBS sind mit Chlorbleiche zu entgiften.

2.2.2.4 Doppelfärbungen

Um zu prüfen, ob CHT1, cChAT und pChAT von intravasalen Monozyten exprimiert werden, wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Dabei wurden neben den entsprechenden Antikörpern gegen CHT1, cChAT oder pChAT ein Antikörper gegen das monozyten-/makrophagenspezifische CD68-artige Antigen (ED1) eingesetzt.

Die Färbungen sind unter 2.2.2.3 beschrieben. Nach der ersten Färbung wurden die Objektträger in Zitratpuffer gebracht und 15 min im Dampfkochtopf gekocht. Nach Abkühlen wurden sie dreimal je 2 min mit PBS gespült. Für Doppelfärbungen erfolgte zuerst der Nachweis des anti-CHT1-, bzw. anti-cChAT und anti-pChAT-Antikörpers. Anschließend wurde mit dem monozyten-/makrophagenspezifischen Antikörper ED1 gefärbt.

2.2.2.5 Nachweis der Spezifität der immunhistologischen Färbung

Die Spezifität der immunhistochemischen Färbung mit anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern wurde mit Hilfe eines Kompetitionsexperimentes getestet, in dem die spezifischen Peptide eingesetzt wurden, die auch zur Immunisierung verwendet worden waren (Pineda-Antikörper-Service, Berlin).

Je 1, 5, 10 und 20 µl Peptidstammlösung (1 µg Peptid/µl) wurden in verschiedenen Ansätzen mit 100 µl Primärantikörperlösung aufgefüllt und auf die jeweiligen Schnitte gebracht. Während 1 h Inkubationszeit bei RT konkurrieren diese spezifischen Peptide und die Antigene des Schnittes um die Primärantikörper. Ein Parallelansatz mit gleicher Antikörperverdünnung ohne Peptidzugabe diente als Kontrolle. Bei Spezifität der Antikörper fällt die Färbung deutlich schwächer aus als bei Färbungen ohne Peptidzugabe.

Sind auch bei Zugabe von 200 µg Peptid/ml Primärantikörperlösung noch Färbungen zu sehen, ist die Antikörperbindung als unspezifisch anzusehen.

2.2.2.6 Gegenfärbung und Eindecken der Schnitte

Die Gegenfärbung wurde mit 1:10 verdünnter Häkalaunlösung für 90 s durchgeführt. Nach dreimaligem Spülen in VE-Wasser wurden die Schnitte für 3 min in Leitungswasser gebläut. Danach wurde erneut dreimal in VE-Wasser abgewaschen.

- a) Schnitte, die mit **DAB als Substrat** gefärbt wurden, können vor dem Eindecken entwässert werden. Dies erfolgt nach folgendem Schema:

- 1.) 3 min VE-Wasser

- 2.) 3 min 50 % Isopropanol
- 3.) 3 min 70 % Isopropanol
- 4.) 3 min 80 % Isopropanol
- 5.) 3 min 90 % Isopropanol
- 6.) 3 min 100 % Isopropanol
- 7.) 2 x 3 min Xylol

Eindecken erfolgte mit Pertex.

- b) Das alkohollösliche Produkt machte eine Entwässerung bei **AP-Nachweis** unsinnig. Die Schnitte wurden für mehrere Stunden in PBS belassen, um nicht umgesetztes Substrat zu entfernen. Dann erfolgte das Eindecken mit Glycergel.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Probenaufbereitung

Um mit den Proben Gelelektrophoresen durchführen zu können, wurde den eingeforenen mononukleären Leukozyten Probenpuffer zugesetzt. Vor der Gelelektrophorese wurde eine Proteinquantifizierung durchgeführt. Weil Mercaptoethanol und Glycerin die Proteingehaltsbestimmung verfälschen, wurden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Leukozyten zunächst in glycerin- und mercaptoethanolfreiem Probenpuffer I lysiert, 5 min im Wasserbad bei 95 °C belassen und anschließend bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Dieses Lysat wurde zur Proteingehaltsbestimmung eingesetzt. Vor der Gelelektrophorese wurde dann glycerin- und mercaptoethanolhaltiger Probenpuffer II zugesetzt.

2.2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde mit Hilfe des *Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kits* durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Vergleich von Absorptionswerten der Proben mit denen einer Verdünnungsreihe eines Standardproteins. Aus der Absorption der unbekannten Proben kann auf ihren Proteingehalt rückgeschlossen werden. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde aus 50 mg Albumin Standard (BSA) eine Standardverdünnungsreihe angefertigt. Je 5 µl der Proben, sowie der Standardverdünnungsreihe wurden mit 45 µl Probenpuffer I verdünnt. Anschließend erfolgte eine Verdünnung 1:50 mit NaCl-Lösung 0,9 %. Als interne Kontrolle wurden von den Lysaten zusätzlich 1:2-Verdünnungen erstellt. Die weitere Durchführung ist der Anleitung des *Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kits* zu ent-

nehmen. Die Absorptionsmessungen wurden mit Hilfe des Plattenspektralphotometers durchgeführt und mit der AlphaDigiDoc-Software die Proteingehalte der Lysate berechnet. Aus je 3 gleichen Ansätzen wurde der Mittelwert ermittelt.

2.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Die Proteine werden zunächst mit einem negativ geladenen Detergens SDS behandelt. Dieses Amphoter interagiert sowohl mit hydrophoben, als auch mit ionischen Proteinbezirken und bewirkt eine Entfaltung des Moleküls. Außerdem erhält das Protein eine stark negative Ladung. Im elektrischen Feld trennen sich die Proteine dadurch nach ihrem Molekulargewicht auf. Je nach dem Molekulargewicht des untersuchten Antigens wurden 12 %ige oder 10 %ige Trenngele gegossen. Die Zusammensetzung der Trenngele ist in Tab. 2 aufgeführt.

	10 % Acrylamid	12 % Acrylamid
H₂O ad inj.	1,83 ml	1,49 ml
Trenngelpuffer	1,08 ml	1,076 ml
Acrylamidlösung	1,46 ml	1,76 ml
Ammoniumperoxidisulfat-Lösung	7,7 µl	7,7 µl
TEMED	3 µl	3 µl

Tab. 2: Rezepte zur Herstellung von 10 %igen und 12 %igen SDS-Trenngelen

3,5 ml Trenngel werden in die Kammer gebracht und mit Aqua ad inj. überschichtet. Nach 40-60 min bei RT war das Gel auspolymerisiert. Das Sammelgel wurde aufgebracht und ein Kamm zur Bildung von Probestaschen eingesetzt. Zur Rezeptur des Sammelgels siehe Tab. 3.

H₂O ad inj.	1,35 ml
Sammelgelpuffer	790 µl
Acrylamidlösung	652 µl
Ammoniumperoxidisulfat-Lösung	5,6 µl
TEMED	2,25 µl

Tab. 3: Rezept zur Herstellung von SDS-Sammelgelen.

Nach ca. 30 min bei RT konnte der Kamm entfernt werden. Die Probestaschen wurden mit Laufpuffer gespült und freigesaugt. Anschließend erfolgte der Zusammenbau der Apparatur.

Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Proben aus isogenen und allogenen Nierentransplantaten wurden in die Probentaschen pipettiert. Je 15 µg Protein, entsprechend 10 µl Pufferlösung, wurden aufgetragen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde in eine Probentasche ein farbiger Molekulargewichtsmarker eingebracht. Nach Beschicken der Taschen wurde 1 h bei 15 mA die Elektrophorese durchgeführt.

2.2.3.4 Blotting

Unter Blotting versteht man das Übertragen der aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran. Vor dem Blotting wurde das Gel 15 min in Blottingpuffer äquilibriert. Die Blottingmembran wurde 15 s in Methanol und 15 min in Blottingpuffer gebracht. Die Proteine wurden 2 h bei 90 mA vom Gel auf die Blottingmembran übertragen. Die Vollständigkeit der Proteinübertragung auf die Membran kann durch anschließende „Coomassie“-Färbung des Gels überprüft werden. Die Membranstreifen wurden 2 x kurz in PBS gewaschen und 1 h auf dem Rüttler bei RT abgesättigt (siehe Tab. 4), um die restlichen Proteinbindungsstellen des Blottingmembran zu blockieren und eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nach Zugabe des Primärantikörpers wurde ü.N. bei 4 °C inkubiert. Die eingesetzten Antikörper sind Tab. 1 zu entnehmen. Dann wurden die Blots 30 min bei RT bewegt. Nach viermaligem Waschen in PBS mit 0,2 % Tween 20 wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper zugesetzt und 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Erneut wurde dreimal für je 10 min in PBS mit 0,2 % Tween 20 und zweimal 5 min in TBS (pH 7,6) gewaschen. Schließlich erfolgte der Nachweis der gebundenen HRP mit dem *SuperSignal® WestPico Chemiluminescent Substrate*. Die Zusammensetzung und Konzentrationen der Absättigungslösungen, der Primärantikörperlösungen und der Sekundärantikörperlösungen unterschieden sich je nach dem zu detektierenden Antigen. Die Bedingungen sind in der folgenden Tab. dargestellt:

Antigen	Absättigungslösung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
CHT1	TTBS + 5 % Milchpulver	1:5000 in TTBS + 5 % Milchpulver	1:5000 in TTBS + 5 % Milchpulver
cChAT	TPBS + 5 % Milchpulver	1:2000 in TPBS + 5 % Milchpulver	1:5000 in TPBS + 2,5 % Milchpulver
pChAT	TTBS + 10 % Milchpulver	1:2000 in TTBS + 5 % Milchpulver	1:5000 in TTBS + 2,5 % Milchpulver

Tab. 4: Reaktionsbedingungen für CHT1, cChAT und pChAT im Westernblot. TTBS=TBS+Tween 0,1 %, TPBS=PBS+Tween 0,1 %

2.2.3.5. Statistische Auswertung der Westernblot-Experimente

Nach Einscannen der Blots erfolgte die densitometrische Auswertung der Banden mittels AlphaEase-Software. Anschließend wurden die Unterschiede zwischen Proben aus isogenen und allogenen Transplantaten mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests statistisch ausgewertet und als Boxplot-Diagramm dargestellt. Für die statistische Auswertung wurden der Mittelwert der Densitometriewerte der Proben aus isogenen Transplantaten 1 gesetzt und die einzelnen Werte der Proben aus allogenen Transplantaten relativ dazu berechnet.

2.2.4 Nachweis und Quantifizierung von mRNA in intravasalen, mononukleären Leukozyten

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Die durch Perfusion (2.2.1.3) und Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen intravaskulären, mononukleären Leukozyten wurden mit Hilfe der PCR auf ihre mRNA-Expression untersucht. Für die RNA-Isolierung aus je 5×10^6 Zellen wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Sie erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Menge der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt.

2.2.4.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Voraussetzung für die Durchführung einer PCR (2.2.4.3) ist das Vorhandensein einer DNA-Matrize. Zur Vermehrung und Quantifizierung einer spezifischen mRNA-Sequenz einer Zelle ist deshalb vor der PCR das Umschreiben der mRNA in cDNA nötig. Die Kombination aus cDNA-Synthese und anschließender PCR wird *reverse transcription*-PCR (RT-PCR) genannt. Nach der RNA-Isolierung wurde das Volumen der RNA-Lösung mit Hilfe der SpeedVac auf 8 µl reduziert, mit 1 µl DNase Puffer und 1 µl DNase I versetzt, um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen. Während 15 min bei 25 °C erfolgte der Verdau der DNA. Nach Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und Erwärmen auf 65 °C für 10 min, wurden 1 µl Oligo-DTs und 1 µl Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) zugegeben. Letztere stellen Substrate für die reverse Transkriptase dar. Nach weiteren 5 min bei 65 °C wurde der Reaktionsansatz abgekühlt und 3 min die Temperatur bei 4 °C gehalten. 4 µl 5x *first strand buffer* und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) wurden zugegeben, um den RNA-Strang zu stabilisieren. Es wurde auf 42 °C erwärmt und diese Temperatur 2 min gehalten. Dann wurde 1 µl *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* zugegeben. Bei 42 °C, dem Temperaturoptimum des Syntheseen-

zyms, erfolgte die Synthese der cDNA für 50 min, bevor für 15 min auf 70 °C erhitzt wurde. Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Versuchsablauf in Tab. 5 dargestellt:

1.)	8 µl RNA + H ₂ O		5 min bei 65 °C
	1 µl DNase-Puffer		3 min bei 4 °C
2.)	1 µl DNase I	4.)	4 µl 5 x first strand buffer
	15 min bei 25 °C		2 µl DTT, 0,1 M
3.)	1 µl EDTA	5.)	2 min bei 42 °C
	10 min bei 65 °C		1 µl Superscript-RT
3.)	1 µl Oligo-DT		50 min bei 42 °C
	1 µl dNTP		15 min bei 70 °C

Tab. 5: Versuchsprotokoll zur Durchführung der reversen Transkription.

2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte *in vitro*, bei der pro Reaktionszyklus eine Verdopplung der Abschnitte erfolgt. Der benötigte Ansatz enthält neben Reaktionspuffern freie dNTPs, thermostabile DNA-Polymerase, MgCl₂-Lösung (25 mM) und zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*forward*- und *reverse*-Primer), die die Zielsequenz flankieren. Grundsätzlich erfolgen bei jedem PCR-Zyklus drei Einzelschritte:

1.) Denaturierung

Bei 94 °C kommt es zur Trennung der DNA in Einzelstränge.

2.) Primeranlagerung (*annealing*)

Die Primer dienen als Startpunkt für die DNA-Synthese und binden in Abhängigkeit ihres mittleren Schmelzpunktes (T_M -Wert) an die komplementäre Einzelstrangsequenz.

3.) Extension

Die hitzestabile Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) synthetisiert DNA vom jeweiligen Primer ausgehend komplementär zur Einzelstrangmatrize. Dabei synthetisiert sie in 5'-3'-Richtung durch Hinzufügen von freien Nucleotiden. Pro Zyklus entstehen Kopien der vorhandenen DNA-Sequenzen. In dieser Arbeit wurde eine Extensionstemperatur von 73 °C verwendet.

Die Primer, Genbanknummern, Produktlängen und Reaktionsbedingungen sind im Folgenden dargestellt. Die Primersynthese erfolgte durch die Fa. MWG-Biotech (Ebersberg).

Primer	Sequenz (5'-3')	Reaktionsbedingungen			
		Accession-Nummer	MgCl ₂	Annealing	Produktlänge
GAPDH for	CGTCTTCACCACCATGGAGA	AF199235	2 mM	60 °C	299 bp
GAPDH rev	CGGCCATCACGCCACAGCTT				
cChAT 1 for	CGTGGCCTGCTGCAACCAGTTCTT	XM_224626.4	1,5 mM	60 °C	416 bp
cChAT 1 rev	TGGTCACACACCACCCGACAGGT				
cChAT 2 for	TGGATGGTCCAGGCACAGGAGAGC	XM_224626.4	1,5 mM	60 °C	101 bp
cChAT 2 rev	GTCATACCAGCGATTGGCTCCGTTTCAG				
pChAT 1 for	GCAGCACTTCCAAGACACC	XM_224626.4	2 mM	59 °C	296 bp
pChAT 1 rev	GTCGGGGCTGTATTCTGC				
pChAT 2 for	GATTTCAGCCTGCCTCA	XM_224626.4	1,5 mM	56 °C	150 bp
pChAT 2 rev	ATGGCCTTGGGTTTCTGG				
CHT1 for	CAAGACCAAGGAGGAAGCCAG	AB030947	1,5 mM	62 °C	150 bp
CHT1 rev	GCAAACATGGAAGTTGCTGA				

Tab. 6: Primer- und Reaktionsbedingungen für die qualitative PCR; (for=forward, rev=reverse).

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. Agarose wirkt wie ein Molekularsieb. Die gewählte Agarosekonzentration beeinflusst die Porenweite und somit entscheidend die Auftrennung der DNA-Fragmente im Gel. Eine hohe Konzentration bedeutet eine enge Porenweite und korreliert mit einer langsameren Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Für den Nachweis von CHT1-, cChAT- und pChAT-Amplifikaten wurde eine Agarosekonzentration von 1,2 % gewählt. 100 ml TAE-Puffer wurden dazu mit 1,2 g Agarose versetzt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Es wurden 1 µl Ethidiumbromid 1 % zugesetzt. Nach Verrühren des Ethidiumbromids konnte die Abkühlung und Härtung des Gels im Gelschlitten erfolgen (ca. 15 min). Den PCR-Produkten wurde pro 5 µl Probe 1 µl Orange G to dye Farbstofflösung zugesetzt. Die Geltaschen wurden dann mit je 12 µl beschickt. Gleichzeitig wurden 10 µl eines Molekulargewichtsstandards in eine Tasche gebracht. In TAE Puffer erfolgte dann bei 100 V die Auftrennung für ca. 20-30 min. Mit Hilfe von UV-Licht (322 nm) wurden die Banden sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera dokumentiert.

2.2.4.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung des PCR-Produkts wurde von der MWG-Biotech AG durchgeführt. Vorher musste die Extraktion des PCR-Produktes aus dem Agarosegel erfolgen. Dazu wurde die entsprechende Bande im UV-Licht mit einem Skalpel ausgeschnitten und die DNA mit dem im *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemischer Nachweis von CHT1, cChAT und pChAT

3.1.1 Unbehandelte Nieren

Die CHT1-, cChAT- und pChAT-Proteinexpression wurde mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen in unbehandelten Nieren von LEW-Ratten (n=3) untersucht. In Kontrollschnitten, bei denen der Primärantikörper nicht aufgetragen wurde, zeigte sich keine Färbung. Da sich für alle drei verwendeten Antikörper sehr ähnliche Färbemuster ergaben, sind exemplarisch in Abb. 7 Färbungen mit anti-pChAT-Antikörpern gezeigt.

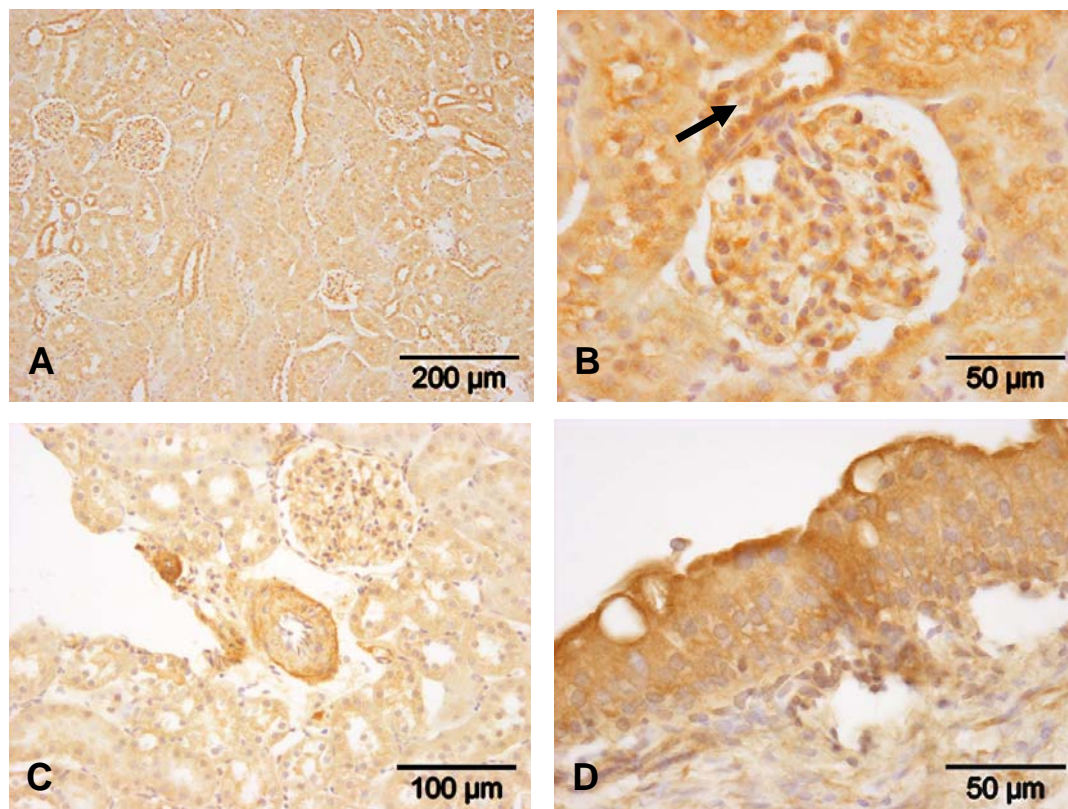


Abb. 7: Färbung einer LEW-Kontrollniere (Paraffinschnitt, pChAT-Nachweis mit einem Peroxidasegekoppelten Nachweissystem in braun; Hämalaun-Gegenfärbung)

A: Neben einer nahezu ubiquitär vorkommenden Braunfärbung sind v.a. Glomeruli deutlich positiv für pChAT. Einige Tubuli sind intensiv gefärbt.

B: Glomerulum der Kontrollniere; einige Zellen des Glomerulums sind deutlich pChAT⁺. Intensiv gefärbte Tubuli lagern sich dem Gefäßpol des Glomerulum an (Pfeil).

C: Intravasal zeigen sich nur wenige, ungefärbte Leukozyten. Das Gefäßendothel des abgebildeten venösen Gefäßes ist ungefärbt, während die Arterie eine kräftige Braunfärbung aufweist.

D: Auffallend ist die kräftige Urothelfärbung im Pelvis renalis, die apikal zunimmt.

Das nahezu ubiquitäre Vorkommen dieser Proteine lässt fast alle Bereiche des Organs bräunlich erscheinen. Es finden sich aber einige renale Strukturen mit stärkerer Färbung: Die Glomeruli weisen eine starke Färbung der Lamina visceralis der Bowmanschen Kapsel auf. Einzelne nicht identifizierte Zellen im Glomerulum treten deutlich hervor. Das Tubulussystem ist unterschiedlich intensiv angefärbt. Nahe dem Gefäßpol der Glomeruli gelegene Tubuli erscheinen intensiv braun (Abb. 7B). Während kapilläres und venöses Endothel ungefärbt sind (Abb. 7C), erscheinen das Endothel und die Lamina muscularis der renalen Arterien tiefbraun (Abb. 7C); perivaskales Bindegewebe ist ungefärbt. Bei der Betrachtung des Pelvis renalis fällt eine kräftige Färbung des Urothels auf. Die Intensität nimmt von basalen zu apikalen Urothelschichten hin zu (Abb. 7D).

3.1.2 Isogen transplantierte Nieren

Nach isogener Nierentransplantation wurde ein immunhistologischer Nachweis von CHT1, cChAT und pChAT in Tagesabständen vom 1. bis 6. postoperativen Tag geführt (jeweils n=1). Da diese Färbungen ein sehr ähnliches Bild zeigen, sind in Abb. 8A exemplarisch Färbungen vom 4. Tag post transplantationem dargestellt. Als Kontrolle dienten Nierenschnitte, bei denen der Primärantikörper weg gelassen wurde. Bei diesen zeigte sich keinerlei Färbung. Färbungen isogen transplanterter Nieren mit anti-CHT1, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern zeigen - wie die der Kontrollnieren - gefärbte Glomeruli. Einige Tubuli weisen eine kräftige Braunfärbung auf. Einige (ca. 20 %) der intravasalen Leukozyten sind schwach cChAT⁺ und pChAT⁺. Mit anti-CHT1-Antikörpern ließen sich ca. 40 % der intravasalen Leukozyten anfärben.

3.1.3 Allogen transplantierte Nieren

Immunhistologische Färbungen wurden in Tagesabständen am 1. bis 6. postoperativen Tag für allogene (n=3) Nierentransplantate durchgeführt. Kontrollen ohne Zugabe des Primärantikörpers wurde mitgeführt und wiesen keine Färbung auf. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (vgl. 1.2.1), wird die akute Abstoßung allogener Nierentransplantate im Tiermodell dieser Arbeit in 3 Phasen unterteilt:

In der 1. Phase (1. und 2. postoperativer Tag) ist histologisch kein Unterschied zwischen der isogenen und der allogenen Situation auszumachen. Es finden sich nur sehr wenige intravasale Leukozyten und kleine perivaskuläre, leukozytäre Infiltrate.

Abb. 8B zeigt Färbungen allogenen transplantierten Nieren mit anti-CHT1-, anti-cChAT und anti-pChAT-Antikörpern am 1. Tag post operationem. Es lassen sich die bereits für die Kontrollniere beschriebenen Strukturen des Nierenparenchyms mit allen Antikörpern anfärben. Im Vergleich zu isogen transplantierten Nieren findet sich eine leicht erhöhte Anzahl intravasaler Leukozyten (Abb. 8B weißer Pfeil). Wie beim isogenen Nierentransplantat, weisen ca. 20 % der intravasalen Leukozyten eine Färbung mit anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern auf. Der Anteil CHT1⁺ Leukozyten ist deutlich höher.

In Abb. 8C und Abb. 8D ist die 2. Phase der akuten Transplantatabstoßung dargestellt. Sie umfasst den 3. und 4. Tag nach allogener Nierentransplantation: Histologisch findet sich eine massive Akkumulation von Leukozyten in den Gefäßen des Transplantates. Während die leukozytären Infiltrate am 3. Tag post transplantationem noch vorwiegend auf den perivaskulären Bereich beschränkt sind, breiten sie sich im weiteren Verlauf auf das gesamte Niereninterstitium aus. Auch die Färbungen allogener Nierentransplantate mit anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern zeigen eine massive intravasale und perivaskuläre Akkumulation immunopositiver Leukozyten. Die für die Kontrollniere typischen Strukturen lassen sich auch am 4. postoperativen Tag mit anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern anfärben. Neben der Leukozytenansammlung im Zentrum des Gefäßlumens finden sich einige wandadhärente Leukozyten. Während am 3. postoperativen Tag ca. 80 % der intravasalen Leukozyten CHT1⁺, cChAT⁺ bzw. pChAT⁺ sind, weisen am 4. Tag der Transplantatabstoßung intravasal nahezu alle Leukozyten eine Braunfärbung auf (weiße Pfeile). Die am 3. postoperativen Tag auftretenden perivaskulären Infiltrate enthalten ebenfalls CHT1⁺, cChAT⁺ bzw. pChAT⁺ Zellen. Einen Tag später ist das Niereninterstitium diffus von immunopositiven Leukozyten durchsetzt.

In der letzten Phase der akuten Nierentransplantatabstoßung (5. und 6. Tag nach allogener Nierentransplantation) sind zwar Strukturen wie Glomeruli und Tubuli noch abgrenzbar, weisen aber bereits massive Destruktionen auf. Das Niereninterstitium ist komplett leukozytär durchsetzt. Wie am 4. Tag weisen auch am 5. und 6. Tag post transplantationem die infiltrierenden Leukozyten eine Braunfärbung auf.

Am 5. und 6. postoperativen Tag finden sich große Mengen immunopositiver Leukozyten in den Venen des allogenen Nierentransplantates. Die Leukozyten sind deutlich vergrößert und polymorph (Abb. 8E weiße Pfeile).

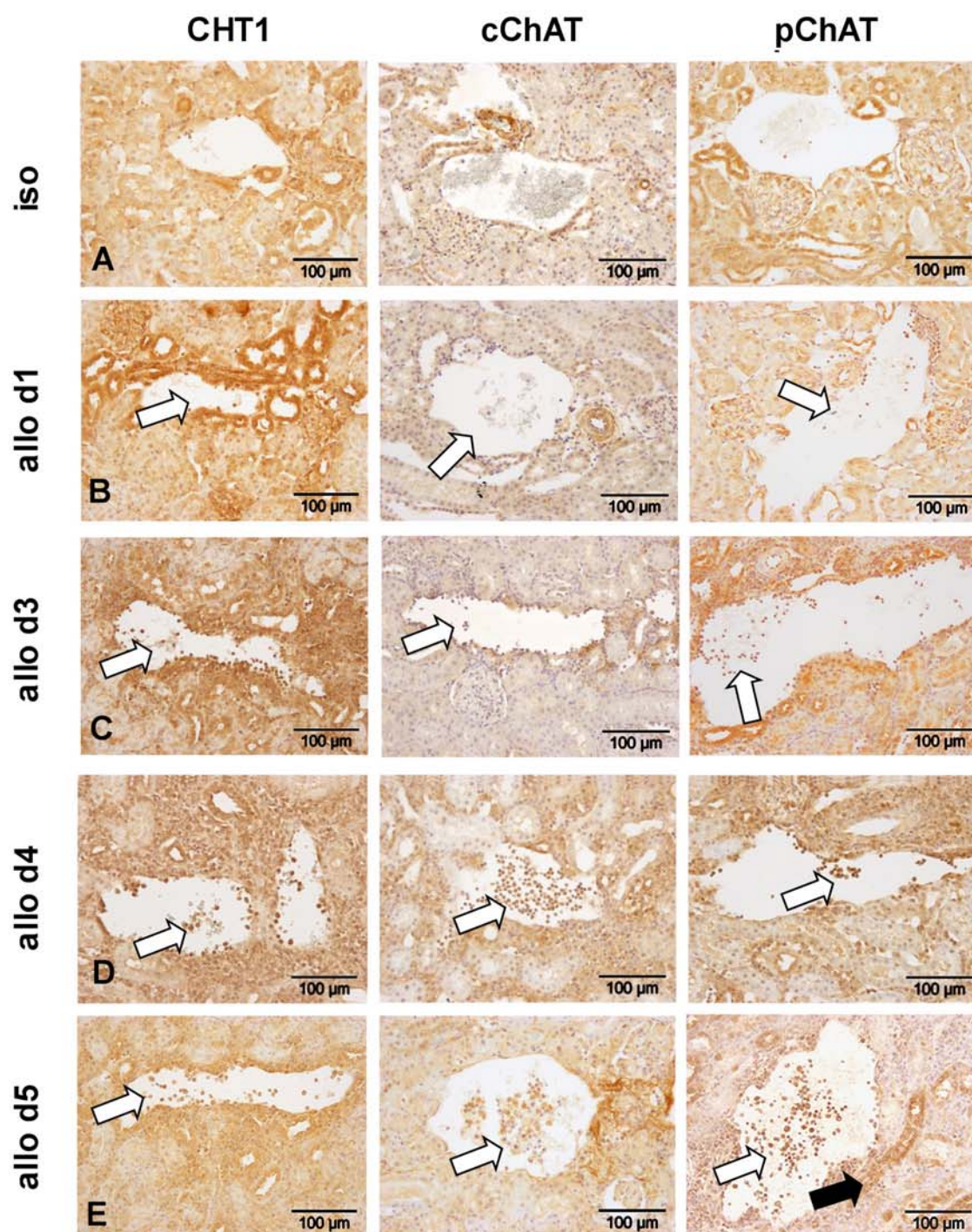


Abb. 8: Immunhistochemische Färbungen zum 1.-6. postoperativen Tag (Paraffinschnitte, Antigennachweis mit einem Peroxidase-gekoppelten Nachweissystem in braun; Hämalaun-Gegenfärbung) (weiße Pfeile = intravasale mononukleäre Leukozyten)

A) Färbungen eines isogenen Nierentransplantates am 4. postoperativen Tag. Die Schnitte mit Färbungen durch anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörper zeigen morphologisch intaktes Gewebe. Die CHT1-, cChAT- bzw. pChAT-positiven Strukturen entsprechen denen der Kontrollnieren. Leukozytäre Infiltrate sind nicht auszumachen. Intravasal sind nur wenige Leukozyten schwach immunoreaktiv.

B) Färbungen nach allogener Nierentransplantation am 1. Tag post operationem. Im Vergleich zur isogenen Nierentransplantation findet sich eine höhere Zahl intravasaler Leukozyten. Diese ließen sich nur leicht mit anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern, jedoch kräftig mit anti-CHT1-Antikörpern anfärben. Unter den intravasalen Leukozyten finden sich noch viele ungefärbte Zellen.

C) Nieren nach allogener Nierentransplantation am 3. postoperativen Tag. Die Niere ist in ihrer Struktur weitgehend intakt. Auffallend sind die Zunahme der intravasalen Leukozyten und die perivaskuläre leukozytäre Infiltration des Gewebes. Die meisten der intravasalen Leukozyten lassen sich durch anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörper kräftig anfärben.

D) Rattennieren am 4. Tag nach allogener Nierentransplantation (DA → LEW). Die schon bei der Kontrollniere gefärbten Strukturen weisen eine unverändert starke Färbung auf. Im Vergleich zum 3. postoperativen Tag nehmen die leukozytären Infiltrate weiter zu und breiten sich in das gesamte Interstitium aus. Die Farbtintensität der intravasalen, mononukleären Leukozyten nimmt deutlich zu.

E) Rattennieren am 5. Tag nach allogener Nierentransplantation (DA → LEW). Glomeruli und tubuläre Strukturen (schwarzer Pfeil) des Nierenparenchyms sind weiterhin intensiv gefärbt, weisen aber Zeichen einer beginnenden Destruktion auf: Leukozytäre Infiltrate sind nicht mehr nur perivasal lokalisiert. Das gesamte Niereninterstitium ist leukozytär durchsetzt. Die intravasalen mononukleären Leukozyten erscheinen deutlich vergrößert und intensiv braun.

3.1.4. Doppelfärbungen allogener Nierentransplantate am 4. postoperativen Tag

Um zu prüfen, ob Monozyten CHT1, cChAT und pChAT exprimieren, wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Abb. 9 zeigt Färbungen, bei denen anti-CHT1-, anti-cChAT- bzw. anti-pChAT-Antikörper blau markiert wurden. Zusätzlich wurden Monozyten mit dem Monozyten-/Makrophagen-spezifischen Antikörper ED 1 rot gefärbt. ED 1 ist gegen ein CD68-artiges Antigen gerichtet.

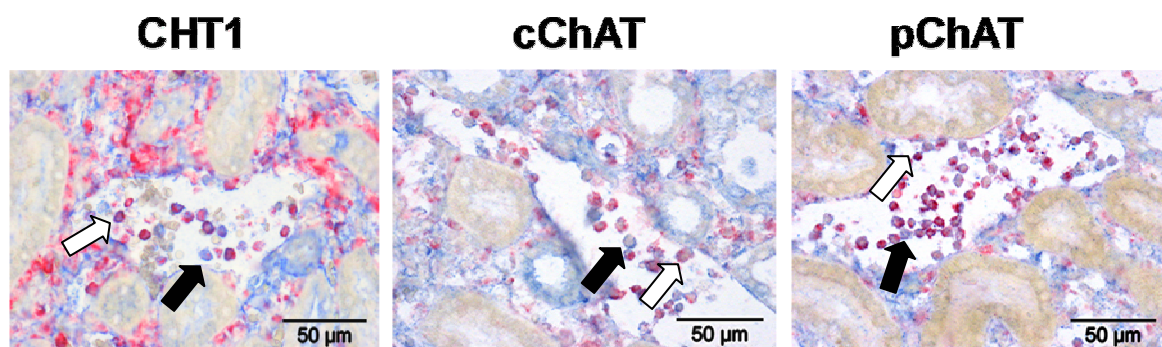


Abb. 9: Doppelfärbungen eines allogenen Nierentransplantates am 4. postoperativen Tag nach Nierentransplantation (DA → LEW) (Paraffinschnitte, Antigennachweis mit AP-gekoppeltem Nachweissystem). Mit blau markiert sind anti-CHT1-, anti-cChAT- bzw. anti-pChAT-Antikörper. Rote Färbung wurde mit dem Monozyten/Makrophagen-spezifischen Antikörper ED1 erreicht. Der Großteil der intravasalen, mononukleären Leukozyten ist doppelt gefärbt und weist eine violette Färbung auf (weiße Pfeile). Einzelne intravasale Leukozyten sind nur blau gefärbt (schwarze Pfeile).

Die in Abb. 9 dargestellten Intravasalräume weisen die für den 4. postoperativen Tag typischen Leukozytenakkumulationen auf. Von diesen intravasalen mononukleären Leukozyten zeigen ca. 70 % eine Doppelfärbung, erscheinen also violett. Die restlichen 30 % intravasaler Leukozyten zeigen allein die Blaufärbung, was auf CHT1-, cChAT- bzw. pChAT-Expression nicht-monozytärer Leukozyten schließen lässt.

3.1.5 Überprüfung der Spezifität der Antikörper gegen CHT1, cChAT und pChAT in der Immunhistochemie

Die Spezifitätstestung der anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörper erfolgte durch Konkurrenzexperimente, die auf Schnitten allogenen transplantierten Nieren am 4. postoperativen Tag durchgeführt wurden. Dazu wurde der Primärantikörperlösung das Peptid, welches auch zur Herstellung des entsprechenden Antikörpers verwendet worden war, zugesetzt. Das Antigen des Organschnittes konkurriert mit dem Peptid um die Antigenbindungsstelle der anti-CHT1-, anti-cChAT- bzw. anti-pChAT-Antikörper (Abb. 10). Alle drei Gegenüberstellungen machen deutlich, dass durch Zugabe von Peptid eine deutliche Abschwächung der Färbung zu erzielen war.

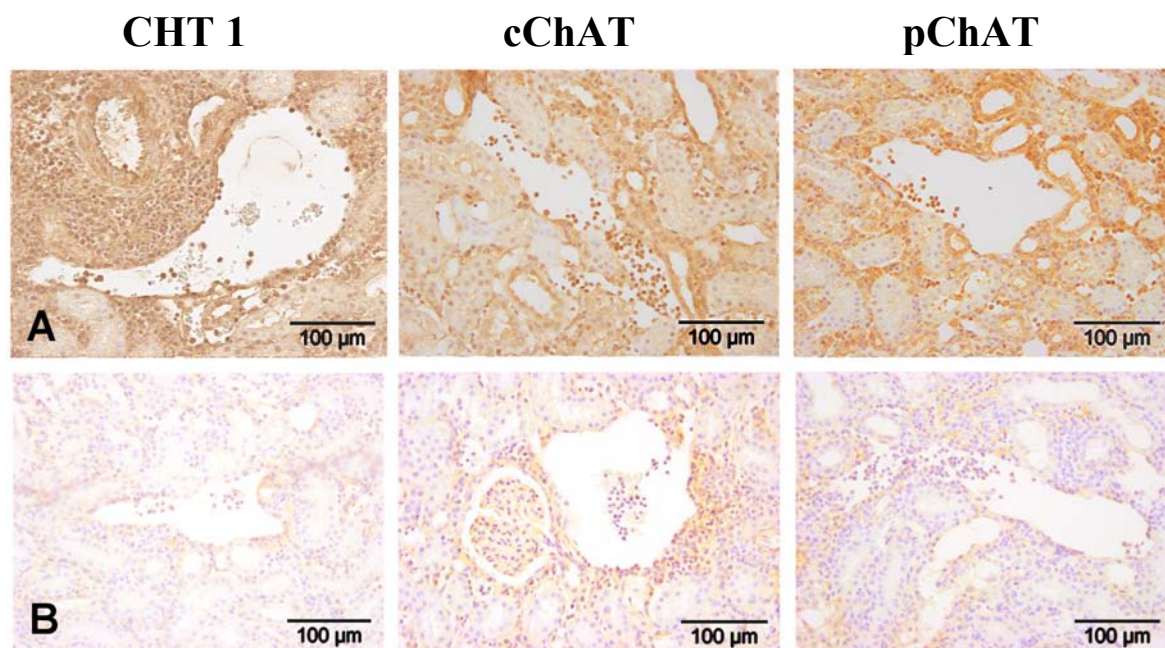


Abb. 10: Konkurrenzexperimente an Schnitten von allogenen transplantierten Nierentransplantaten vom 4. postoperativen Tag (Paraffinschnitte, Antigennachweis mit Peroxidase-gekoppeltem Nachweissystem in braun, Hämalun-Gegenfärbung)

Mit der Zugabe des jeweiligen Peptids, das auch zur Herstellung der Antiseren verwendet wurde, zur Primärantikörperlösung gelingt es nicht mehr, mit anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern eine Färbung der intravasalen Leukozyten zu erzielen. A zeigt Färbungen ohne, B mit Peptidzugabe zur Antikörperlösung.

3.2 Nachweis von CHT1, cChAT und pChAT im Westernblot

Um den CHT1-, cChAT- und pChAT-Nachweis und die gesteigerte Expression der drei Antigene in intravasalen mononukleären Leukozyten während der akuten Abstoßungsreaktion zu bestätigen, wurden Westernblot-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die intravasalen, mononukleären Leukozyten am 4. postoperativen Tag durch intensive Perfusion des Transplantates und anschließende Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (siehe 2.2.1.3 und 2.2.1.4).

Anschließend erfolgte der Antigennachweis im Westernblot mit anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern. In Abb. 11A sind die Ergebnisse des Proteinnachweises gezeigt. Mit anti-CHT1-Antikörpern waren in Proben aus isogen transplantierten Nieren keine Banden detektierbar. Proben aus allogenen Nierentransplantaten zeigten eine kräftige Bande bei 67 kDa und eine weitere Bande bei 99 kDa, die vermutlich unspezifisch ist (s.u.). Mit Hilfe von anti-cChAT-Antikörpern konnte sowohl in Proben aus isogen als auch aus allogenen transplantierten Rattennieren eine Bande mit dem Molekulargewicht 69 kDa nachgewiesen werden. Proben aus allogenen Nierentransplantaten wiesen eine weitere schwach gefärbte Bande mit einem Molekulargewicht von 92 kDa auf. Der pChAT-Proteinnachweis ergab eine 50 kDa-Bande sowohl in Proben aus dem iso- als auch aus dem allogenen Nierentransplantat. Abb. 11A zeigt deutliche Unterschiede in den Bandenstärke zwischen mononukleären Leukozyten aus den Gefäßen von isogenen und allogenen Transplantaten, die densitometrisch gemessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Rangsummentest. Das Ausmessen der 67 kDa-Bande im CHT1-Blot (je n=7) ergab eine signifikante Steigerung der CHT1-Expression in intravasalen Leukozyten während der akuten Transplantatabstoßung verglichen mit Proben aus isogenen Nierentransplantaten ($p \leq 0,05$). Die cChAT-Expression (je n=7) war hochsignifikant erhöht in Proben aus dem allogenen Nierentransplantat im Vergleich zu Proben aus isogen transplantierten Nieren ($p \leq 0,01$). Für pChAT ergab sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Proteinexpression in intravasalen Leukozyten aus allogenen transplantierten Nieren ($p \leq 0,05$).

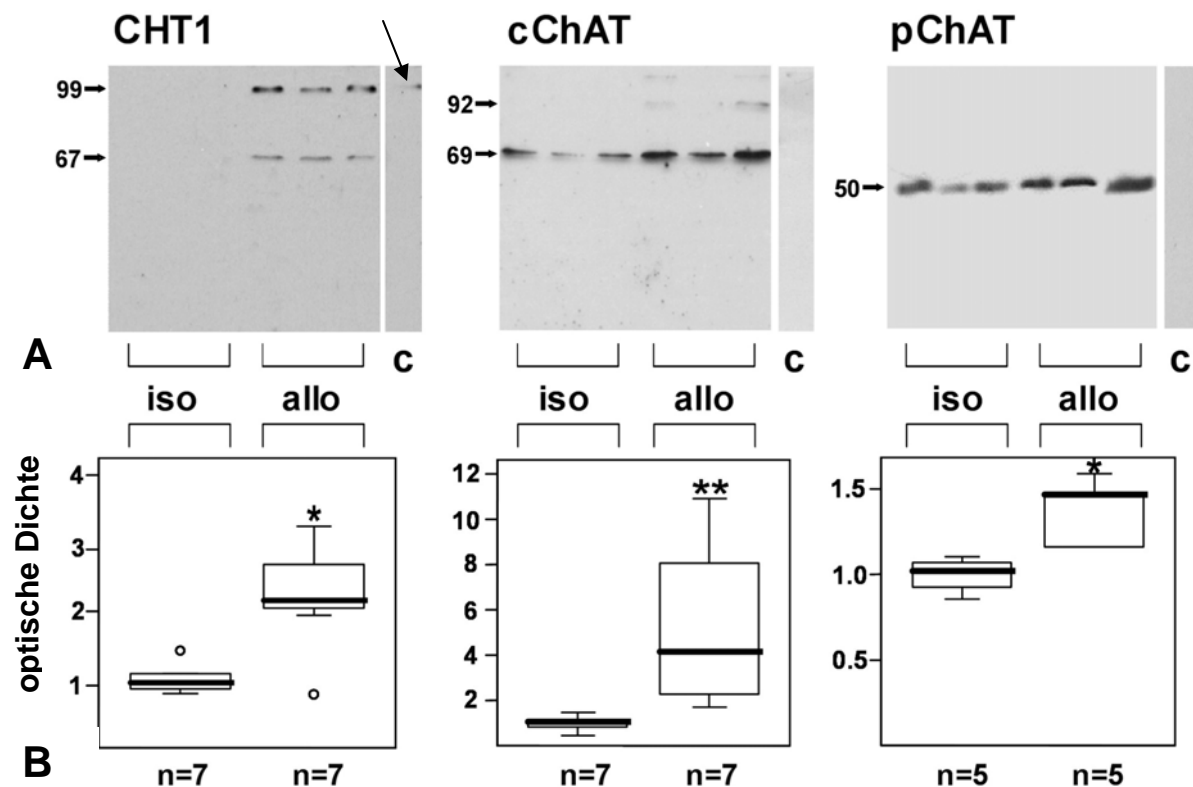


Abb. 11: Westernblots intravasaler mononukleärer Leukozyten aus isogen und allogenen transplantierten Nieren. Gezeigt sind repräsentative Westernblots mit jeweils 3 Proben (A). In die Auswertung gingen höhere Probenzahlen ein (B). Die detektierten Molekulargewichte sind für CHT1 67 und 99 kDa (unspezifisch), für cChAT 69 und 92 kDa und für pChAT 50 kDa. Jeweils rechts neben dem Blot ist das Konkurrenzexperiment (c) dargestellt: Auf das Gel aufgetragen ist eine Probe aus einer allogenen transplantierten Niere. Nach Zugabe von Peptid zur Primärantikörperlösung war nur noch die 99 kDa-Bande beim CHT1-Blot detektierbar (Pfeil). Sie ist somit als unspezifisch zu werten. Alle anderen Banden sind spezifisch.

Die statistische Auswertung der Densitometrie erfolgte mittels Mann-Whitney-Rangsummentest. Im Vergleich zu Proben aus isogen transplantierten Nieren ist in solchen aus allogenen transplantierten Nieren die CHT1-Expression (n=7)- und pChAT-Expression (n=5) signifikant (* $p \leq 0,05$), die cChAT-Expression (n=7) hochsignifikant (** $p \leq 0,01$) gesteigert. Die Boxplots zeigen jeweils den Median, den Bereich zwischen der 25 %- und 75 %-Quartile, sowie den Maximal- und Minimalwert.

Für die Überprüfung der Spezifität des CHT1-, cChAT- und pChAT-Nachweises wurde eine Probe Leukozytenlysat aus dem allogenen Nierentransplantat auf ein Gel aufgetragen und geblottet. Den entsprechenden Primärantikörperlösungen wurde pro ml 200 µg vom jeweiligen Peptid zugegeben, das auch bei der Antikörperherstellung verwendet wurde (siehe 2.2.2.5). Das Peptid konkurriert mit den Epitopen auf dem Blot um die Bindung der spezifischen Antikörper und schwächt damit die Intensität der Färbung ab. Allein die 99 kDa-Bande des CHT1-Blots war noch nachweisbar und ist somit als unspezifisch zu werten. Alle übrigen Banden waren auf den entsprechenden Blots nicht mehr detektierbar.

3.3 Nachweis von CHT1- und cChAT-mRNA in intravasalen, mononukleären Leukozyten

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die CHT1-, cChAT- und pChAT-mRNA-Expression in intravasalen, mononukleären Leukozytenfraktionen aus je 4 isogenen und allogenen Transplantaten analysiert. Für CHT1 ergab sich die erwartete Produktlänge von 150 bp. Der Vergleich zwischen Proben aus isogen und allogenen transplantierten Nieren zeigt, dass die mRNA-Expression in Leukozyten aus allogenen Nierentransplantaten erhöht ist. Um cChAT-mRNA zu detektieren, war eine nested-RT-PCR notwendig. Die nachgewiesene Bande mit 101 bp Länge entspricht ebenfalls der erwarteten Produktlänge. Proben aus isogen transplantierten Nieren wiesen eine schwache Bande, Proben aus allogenen transplantierten Nieren eine kräftigere Bande bei 101 bp auf. Die cChAT-mRNA-Expression ist in Leukozyten aus den Gefäßen allogener Nierentransplantate gesteigert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte, dass diese den erwarteten Sequenzen der cChAT- und CHT1-Gene entsprechen. Trotz Einsatz der nested-RT-PCR war pChAT mRNA nicht nachweisbar. Das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als interne Kontrolle.

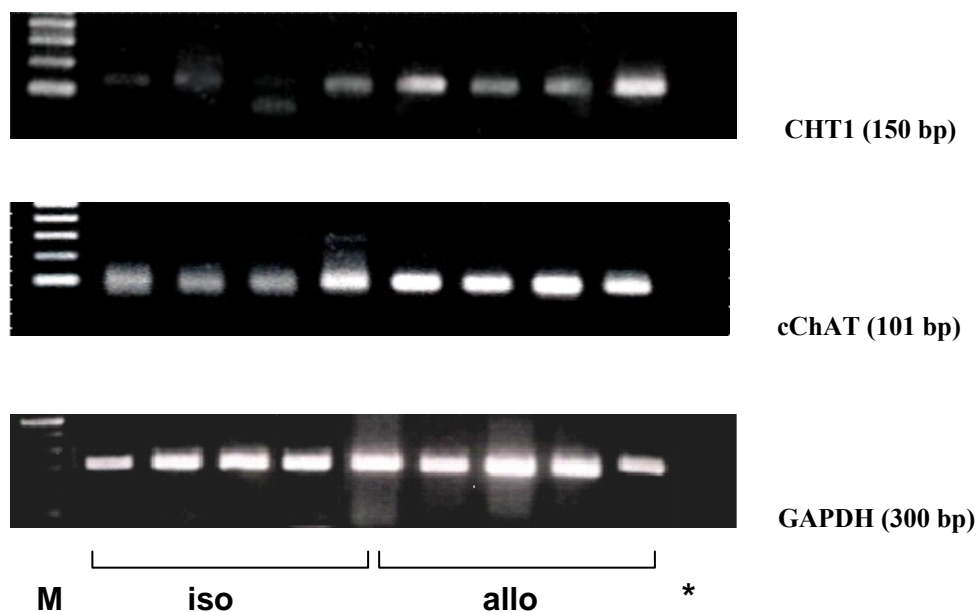


Abb. 12: Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis von CHT1-, cChAT- und GAPDH-mRNA:

Gezeigt sind mit DNA beladene Ethidiumbromidgele. GAPDH diente als interne Kontrolle. Sowohl nach isogener, als auch nach allogener Nierentransplantation lassen sich CHT1- und cChAT-mRNA in intravasalen, mononukleären Leukozyten detektieren. Sowohl für CHT1, als auch für cChAT kann auf mRNA-Ebene eine gesteigerte Expression in Proben aus allogenen Nierentransplantaten im Vergleich zu Proben aus isogenen Nierentransplantaten gezeigt werden. * = H₂O-Kontrolle, M = Marker

3.4 ACh-Gehalt in intravasalen mononukleären Leukozyten aus isogen und allogenen transplantierten Nieren*

Um den intrazellulären ACh-Gehalt zu messen, wurden am 4. postoperativen Tag intravasale Leukozyten isogener (n=12) und allogener Nierentransplantate (n=12) isoliert. Die weitere Analyse erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Ignaz Wessler im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsklinik Mainz mittels HPLC in Kombination mit enzymatischen Verdau und elektrochemischem Nachweis. Proben aus isogenen Nierentransplantaten enthielten $0,12 \pm 0,16$ pmol ACh pro eine Millionen Leukozyten. In Proben aus allogenen Nierentransplantaten konnte ein ACh-Gehalt von $0,79 \pm 0,69$ pmol ACh in einer Millionen Leukozyten gemessen werden. Verglichen mit isogenen Nierentransplantaten zeigte sich für allogene Transplantate eine hochsignifikante Erhöhung des ACh-Gehaltes ($p \leq 0,001$).

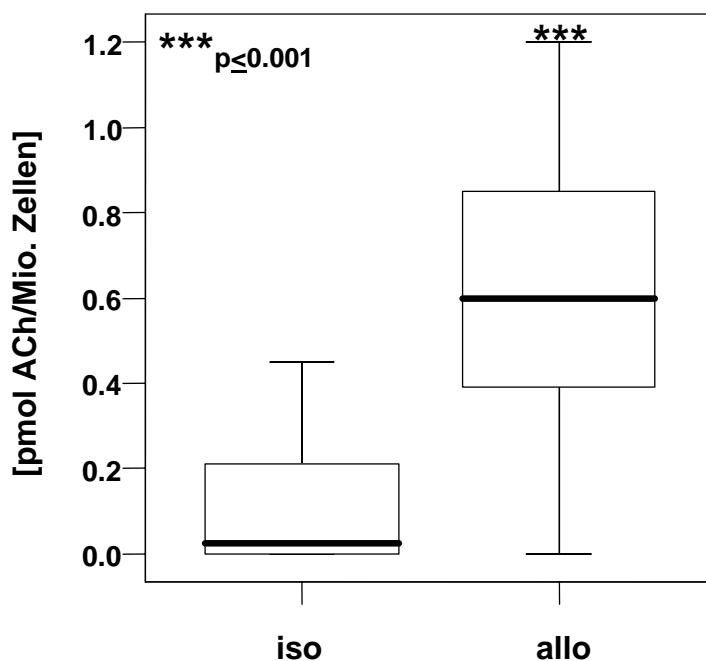


Abb. 13: Vergleich des intrazellulären ACh-Gehaltes von intravasalen Leukozyten aus isogenen (n=12) vs. allogenen (n=12) Nierentransplantaten. Das Boxplot Diagramm zeigt eine hochsignifikante Steigerung des intrazellulären ACh-Gehaltes in pmol pro eine Mio. Leukozyten. Es zeigt jeweils den Median, die 25%- und 75%-Quartilen, sowie den Maximal- und Minimalwert der ACh-Konzentration.

* Der Vollständigkeit halber ist die Messung des ACh-Gehaltes intravasaler mononukleärer Leukozyten dargestellt. Diese Experimente wurden nicht vom Doktoranden durchgeführt, komplettieren aber die Ergebnisse des Projektes.

4. Diskussion

Die akute Abstoßung voll allogener Nierentransplantate ist eine extrem heftige Immunreaktion. Im Tiermodell dieser Arbeit ist diese Abstoßungsreaktion ab dem 5. postoperativen Tag irreversibel und führt innerhalb von 6 bis 8 Tagen post transplantationem zum Tod. Im postoperativen Verlauf nach allogener Nierentransplantation kommt es zur massiven intravasalen Akkumulation und Aktivierung der mononukleären Leukozyten (59).

Die Methode der Perfusion erlaubt es, neben den zentral im Gefäßlumen gelegenen Leukozyten, auch die wandadhärenten Leukozyten zu isolieren (59). Mittels RT-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es am 4. postoperativen Tag auf mRNA-Ebene zu einer Expressionsteigerung des Cholintransporters CHT1 und des ACh-synthetisierenden Enzyms cChAT in diesen intravasalen, mononukleären Leukozyten des Transplantates kommt. In Westernblot-Experimenten konnte die Steigerung der Expression von CHT1 und cChAT auf Proteinebene bestätigt werden. Während pChAT-mRNA mittels *nested*-RT-PCR nicht nachweisbar war, kam es auf Proteinebene zu einer Hochregulation von pChAT. Um einen Eindruck von der Lokalisation der Proteinexpression von CHT1, cChAT und pChAT zu bekommen, wurden immunhistochemische Färbungen an Kontrollnieren, isogen und allogenen transplantierten Nieren vorgenommen. Diese Färbungen zeigten, dass sich neben aktivierten intravasalen, mononukleären Leukozyten der allogenen transplantierten Niere auch Tubuli, Glomeruli und das Urothel des Pelvis renalis mit anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörpern anfärben lassen. Am 4. postoperativen Tag sind mehr als 70 % der intravasalen, mononukleären Leukozyten Monozyten (59). Diese wurden in Doppelfärbungen zusätzlich zur Färbung von CHT1, cChAT bzw. pChAT mit dem monozyten-/makrophagenspezifischen ED1-Antikörper markiert. Die deutliche Mehrheit der intravasalen, Leukozyten war doppelt gefärbt und damit monozytär.

Neben dem ACh-Syntheseapparat, bestehend aus CHT1 und ChAT, wurde am 4. postoperativen Tag auch der ACh-Gehalt in intravasalen, mononukleären Leukozyten aus allogenen transplantierten Nieren mit dem aus isogen transplantierten Nieren verglichen. Während der akuten Abstoßungsreaktion ist der ACh-Gehalt in intravasalen, mononukleären Leukozyten deutlich gesteigert.

Im Folgenden sollen diese Ergebnisse diskutiert und eingeordnet werden.

4.1 Vorteile des Tiermodells

Mit der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, Erkenntnisse über die ACh-Synthese intravasaler, mononukleärer Leukozyten zu erlangen. Die Analyse von Zellen aus Nierentransplantaten bietet dafür einige wichtige Vorteile:

- 1.) In Transplantaten finden immunologische Vorgänge weitgehend losgelöst von neuraler Beeinflussung statt. Neben dem Ureter werden A. und V. renalis anastomosiert, Nerven hingegen nicht. In dieser Arbeit überleben die Tiere nach Implantation eines allogenen Nierentransplantates ca. 7 Tage. Eine Reinnervation innerhalb dieses kurzen Zeitraums ist nahezu ausgeschlossen (61).
- 2.) Die akute Transplantatabstoßung stellt ein fulminantes immunologisches Geschehen dar, bei dem intravasale Leukozyten massiv aktiviert werden (59). Entzündungsbedingte Regulationen der Expression von ACh-synthetisierenden Proteinen in intravasalen mononukleären Leukozyten können untersucht werden, nachdem diese durch intensive Perfusion und Zellaufreinigung gewonnen wurden.
- 3.) Neben der allogenen Transplantation bietet das Tiermodell mit der isogenen Transplantation eine geeignete Kontrollgruppe. Auch im isogenen Nierentransplantat kommt es zum Ischämie-Reperfusionsschaden, der durch die Operation per se bedingt ist. Auch isogene Transplantate sind denerviert. Isogene Transplantate stellen also die ideale Kontrolle für die Analyse der akuten Organabstoßung dar.

4.2 Intravasale mononukleäre Leukozyten exprimieren CHT1, cChAT und pChAT

Um zu klären, ob intravasale, mononukleäre Leukozyten CHT1, cChAT und pChAT exprimieren, wurden immunhistochemische Färbungen, Westernblots und RT-PCR durchgeführt. In der Immunhistochemie zeigte sich am 4. postoperativen Tag eine deutliche Färbung intravasaler, mononukleärer Leukozyten aus der allogenen transplantierten Niere. Um sicherzustellen, dass die Antikörperbindung, die zu dieser Färbung geführt hatte, spezifisch war, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Die deutliche Abnahme der Färbung nach Peptidzugabe ist ein Hinweis auf eine spezifische Bindung der anti-CHT1-, anti-cChAT- und anti-pChAT-Antikörper. Zusätzlich wurden einige Kontrollexperimente routinemäßig durchgeführt: Bei allen Färbungen wurden Kontrollen ohne Zugabe von Primärantikörperlösung mit-

geführt. Bei den gezeigten Färbungen waren diese Kontrollen negativ. Die Ergebnisse des Westernblots sind in Abb. 11 dargestellt. Das klassische 69 kDa schwere cChAT-Protein konnte in intravasalen Leukozyten nachgewiesen werden (Tab. 7). cChAT ist typisch für cholinerge Neurone (113), wurde aber auch in non-neuronalen Zellen nachgewiesen (123).

Untersuchtes Protein	Molekulargewichte
CHT1	50 kDa (98), 78 kDa (98), 63,4 kDa (115)
cChAT	69 kDa (173), 54 kDa (91), 46 kDa (123) 41 kDa (91), 30 kDa (123)
pChAT	50 kDa (123, 153)

Tab. 7: In der Literatur werden für CHT1, cChAT und pChAT verschiedene Molekulargewichte beschrieben. Die Tab. liefert eine Übersicht über die bisher beschriebenen Molekulargewichte.

Die Molekulargewichte von CHT1, cChAT und pChAT im Westernblot stimmen mit den Literaturangaben überein (Tab. 7). Die von uns gemessenen 69 kDa für cChAT wurden bereits für Proteinextrakte aus dem ZNS, dem Dottersack und der Placenta beschrieben (123). Die 50 kDa-Bande, die mit pChAT-Antikörpern detektiert wurde, ist bereits von Tooyama und Kimura beschrieben worden (153). Mit anti-CHT1-Antikörpern konnte eine Bande bei 67 kDa detektiert werden. Diese liegt etwas höher als die in der Literatur beschriebene 63,4 kDa-Bande von Okuda et al. (115). Dieser geringe Molekulargewichtsunterschied kann durchaus auf kleine methodische Unterschiede zwischen den Laboren zurückzuführen sein.

Auch im Westernblot wurde die Spezifität der Antikörperbindung mittels Konkurrenzexperimenten überprüft. Wie in Abb. 11 dargestellt, war die 99 kDa-Bande des CHT1-Blots trotz Zugabe von Peptid zur Primärantikörperlösung noch vorhanden. Sie ist somit als unspezifisch zu werten. Alle übrigen Banden waren auf den entsprechenden Westernblots nicht mehr detektierbar. Sie beruhen auf einer spezifischen Antikörperbindung.

Bei allen RT-PCR-Experimenten wurden Wasserkontrollen mitgeführt, um DNA-Kontaminationen auszuschließen. In diesen Kontrollexperimenten wurde erwartungsgemäß keine DNA amplifiziert. GAPDH diente als interne Positivkontrolle. Wie in Abb. 12 gezeigt, ergaben sich für GAPDH gleich kräftige Banden, was für eine gelungene reverse Transkription, RNA-Aufreinigung und homogene cDNA-Menge spricht. Abschließend wurden die Produkte der CHT1-, cChAT- und PCR sequenziert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte, dass diese den erwarteten Sequenzen der CHT1- und cChAT-Gene entsprechen.

pChAT ist zwar auf Proteinebene, nicht jedoch auf mRNA-Ebene nachweisbar

Wie in der Einleitung erläutert, wird in der Literatur eine Variante der ChAT beschrieben, bei der die Exone 6-9 durch alternatives Spleißen verloren gegangen sind. Diese in peripheren, autonomen Neuronen exprimierte Form wird pChAT genannt (153). Zusätzlich zum Nachweis von cChAT konnte in der Immunhistochemie und im Westernblot ein pChAT-immunoreaktives Protein nachgewiesen werden. Die im Westernblot ausgemessene Bande entsprach dem erwarteten Molekulargewicht (Tab. 7). Im Gegensatz zu cChAT gelang es jedoch nicht, pChAT-mRNA in der *nested*-RT-PCR nachzuweisen. Diese Schwierigkeiten im Nachweis von pChAT auf mRNA-Ebene sind auch für Rattennetzhaut und –plazenta beschrieben. In diesen Organen scheiterten andere Autoren ebenfalls am Nachweis mittels RT-PCR, wohingegen das pChAT-Protein deutlich nachweisbar war (123, 175). Auch die funktionelle Aktivität von pChAT wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So kommt einigen Aminosäuren, die von den Exonen 6-9 kodiert werden, eine essentielle Bedeutung für die Funktion des Syntheseeenzyms zu (15). pChAT, dem diese Exone fehlen, wäre demnach nicht funktionsfähig. Andererseits konnte für pChAT, das durch Immunpräzipitation aus Ganglien der Ratte isoliert wurde, eine Enzymaktivität nachgewiesen werden (3, 56). Weitere Arbeiten sind nötig, um die Bedeutung von pChAT für die ACh-Synthese von intravasalen Leukozyten, sowie die Diskrepanz zwischen den Daten zur mRNA und zum Protein zu klären.

4.4 Funktionen von CHT1 und cChAT

Der Mechanismus der ACh-Synthese in non-neuronalen Zellen scheint dem der neuronalen zu gleichen: Entscheidende Schritte sind die Cholinaufnahme in die Zellen und die eigentliche ACh-Synthese durch eine Azetyltransferase, die den Azetyl-Rest von Azetyl-CoA auf Cholin transferiert (135).

Während Cholin über den Cholintransporter CHT1 in die Zelle aufgenommen wird, liegt Azetyl-CoA intrazellulär in Überschuss vor. In dieser Arbeit konnte eine deutliche Expressionssteigerung der ChAT nachgewiesen werden. Die Spezifität von ChAT für den Azetyl-Rest ist jedoch so gering, dass von einer gesteigerten ChAT-Expression nicht auf eine erhöhte intrazelluläre ACh-Synthese rückgeschlossen werden darf. Neben Azetyl-CoA könnten auch andere Alkyl-Reste (Propionyl-CoA, Butyryl-CoA usw.) auf Cholin übertragen werden (135).

Auch Proteine können durch ChAT acetyliert werden (135). Der Beweis für die Synthese von ACh *in vivo* kann daher nur durch direkte Bestimmung des ACh-Gehaltes *ex vivo* erfolgen.

Auch für non-neuronale Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Cholinaufnahme durch den hochaffinen Cholintransporter CHT1 erfolgt (60, 114, 122). Die Cholinaufnahme ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ACh-Synthese in neuronalen Zellen (101). Cholin dient nicht nur als ein Baustein intrazellulärer ACh-Synthese, sondern wird von der Zelle z.B. für die Synthese von Membranlipiden benötigt (101). Dennoch ist in der Literatur eine Korrelation zwischen CHT1-Dichte und ACh-Sekretion der Zelle beschrieben (42). Neben dem hoch-affinen CHT1 sind viele niedrig-affine Cholintransporter und CTLs bekannt (155). Auch für Monozyten darf angenommen werden, dass die Aufnahme von Cholin der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine akute Abstoßungsreaktion mit gesteigerter leukozytärer CHT1-Expression einhergeht. Diese Hochregulation von CHT1 während der akuten Transplantatabstoßung kann in einer effizienten ACh-Produktion resultieren. Die Messung des intrazellulären ACh-Gehaltes der mononukleären, intravasalen Leukozyten aus der allogenen transplantierten Niere bestätigt diese Hypothese.

Die Synthese von ACh aus Azetyl-CoA und Cholin kann in neuronalen und non-neuronalen Zellen durch Spleiß-Varianten von ChAT erfolgen (113, 153, 170). Wie in der Einleitung beschrieben, gilt cChAT als klassisches neuronales Syntheseezym, während viele periphere Zellen neben cChAT auch pChAT exprimieren (20, 110, 153). Auch ChAT-negative Zellen könnten ACh produzieren: Für Skelettmuskelzellen und Harnblasenurothel konnte die Carnitin-Azetyltransferase als Syntheseezym identifiziert werden. (99, 156). Im Vergleich zur klassischen ChAT resultiert ihre Expression in einer weniger effektiven ACh-Synthese (171). Neben dem o.g. leistungsstarken Cholintransporter CHT1 steht den intravasalen Transplantatleukozyten somit auch das effiziente Syntheseezym, ChAT, zur Verfügung. Trotz der vielfältigen Funktionen stellt somit die ACh-Synthese die vermutlich wichtigste Funktion von CHT1 und ChAT dar. Dies wird auch dadurch untermauert, dass auch eine gesteigerte ACh-Menge in intravasalen mononukleären Leukozyten während der akuten Transplantatabstoßung nachgewiesen werden konnte.

4.5 Quellen intravasalen Azetylcholins

Die Hochregulation der CHT1- und cChAT-Expression in intravasalen mononukleären Leukozyten während der akuten Transplantatabstoßung ließ sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigen. Auch der Gehalt an intrazellulärem ACh stieg auf das mehr als 6fache an. Zu klären bleibt die Frage, welchen Anteil die jeweiligen Leukozytensubpopulationen an der intravasalen ACh-Produktion im Nierentransplantat haben.

Aus *in vitro*-Studien liegen Ergebnisse vor, die T-Lymphozyten als ChAT-exprimierende und damit cholinerge Leukozyten identifizieren (85). Kawashima und Fujii machen sie für den ACh-Spiegel im menschlichen Blut verantwortlich (85). Die Arbeitsgruppen um Fujii (47, 49) und Rinner (133) untersuchten Leukozyten vom Menschen und der Ratte sowie verschiedene Zelllinien auf ihre ChAT-Expression. Ihre Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt. Während die größte Rolle für die ACh-Produktion sowohl im Mensch, als auch in der Ratte, den T-Lymphozyten zugesprochen wurde, sind für B-Lymphozyten widersprüchliche Ergebnisse publiziert (Tab. 8). Während humane B-Lymphozyten als ChAT-negativ identifiziert wurden, wiesen B-Lymphozyten aus der Ratte ca. dreimal niedrigere intrazelluläre ACh-Spiegel auf als T-Lymphozyten der Ratte, sodass auch B-Lymphozyten potentielle Quellen intravasalen ACh darstellen könnten. Im Tiermodell dieser Arbeit stellen T- und B-Lymphozyten 22 % der intravasalen, mononukleären Leukozyten des allogenen Nierentransplantates (59). Dieser Befund passt zu den Doppelfärbungen, bei denen neben CHT1, cChAT und pChAT Monozyten mit dem Monozyten-/Makrophagen-spezifischen ED1-Antikörper gefärbt wurden. Während die Mehrheit (ca. 70 %) der intravasalen Leukozyten doppelt gefärbt und damit monozytär sind, finden sich auch Leukozyten, die nur CHT1⁺, cChAT⁺ und pChAT⁺ sind. Cholinerge Lymphozyten haben sicherlich großen Anteil an dieser Fraktion. Im Vergleich zu Monozytenzelllinien weisen Lymphozyten einen mehr als 100fachen ACh-Gehalt auf (Tab. 8). Neben den Monozyten kommen somit v.a. die Lymphozyten als Quelle des leukozytären ACh-Anstiegs während der akuten Transplantatabstoßung in Frage. Dass die ACh-Synthese in Lymphozyten Regulationen unterliegt, konnte bereits gezeigt werden: In Ratten konnte während vasaler Hypertension eine Herunterregulation der ACh-Synthese in zirkulierenden mononukleären Leukozyten gezeigt werden (50). In *in vitro*-Experimenten konnte durch Concanavalin A- und Phytohaemagglutinin-Gabe eine gesteigerte Expression des ACh-Syntheseapparates in Lymphozyten erreicht werden (49, 87, 133).

Untersuchte Zellen	Zelllinie	ACh-Gehalt [pmol/10 ⁶ Zellen]	ACh-Synthese [pmol/mg Protein/min]	ChAT- Expression
<i>Fujii (49) [Mensch]</i>				
Humane mononukleäre Leukozyten		0,3	27,5	positiv
<i>Fujii (47) [Mensch]</i>				
HSB-2	T-Zelllinie	36,2	1,4	positiv
MOLT-3	T-Zelllinie	251,5	22,4	positiv
MOLT-4	T-Zelllinie	38,8	8,0	positiv
HPB-ALL	T-Zelllinie	0,7	0,7	positiv
BALL-1	B-Zelllinie	n.d.	0,4	negativ
NALM-6	Prälymphomzelllinie	0,3	0,14	negativ
U397	Monozytenzelllinie	0,02	0,18	negativ
<i>Rinner (133) [Ratte]</i>				
Primäre T-Lymphozyten	T-Zellen	9,94		positiv
Primäre B-Lymphozyten	B-Zellen	3,24		positiv

Tab. 8: Untersuchungen zur leukozytären ACh-Synthese: Leukozytengemische und Zelllinien vom Menschen wurden bzgl. ihres ACh-Gehaltes, der ACh-Syntheseaktivität und der ChAT-Expression untersucht. Rinner untersuchte Rattenleukozyten. Auffällig sind die negativen Ergebnisse der Monozytenzelllinie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass aktivierte Monozyten aus allogenen Nierentransplantaten nicht nur cholinerg sind, sondern die monozytäre Expression von Proteinen des ACh-Syntheseapparates während der akuten Transplantatabstoßung erhöht ist:

Monozyten stellen mit ca. 70 % den größten Anteil der intravasalen mononukleären Leukozyten der allogenen transplantierten Niere (59). Im Vergleich zum isogenen Transplantat nimmt der relative Anteil der Monozyten an den Leukozyten zu.

Einen wichtigen Hinweis auf eine monozytäre ACh-Synthese liefern immunhistochemische Doppelfärbungen, die unter 2.2.2.4 beschrieben sind. ED1-Antikörper gelten als Marker für Monozyten und Makrophagen der Ratte (30). Bei Doppelfärbungen wurden zusätzlich noch Einzelfärbungen mit den jeweiligen Antikörpern erstellt. Diese Kontrollen zeigten jeweils eine saubere Einzelfärbung mit anti-CHT1-, anti-cChAT-, anti-pChAT- und ED1-Antikörpern. Die Mehrheit der intravasalen Leukozyten ist doppelt gefärbt und stellt somit cholinerge Monozyten dar.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass monozytäre Zelllinien *in vitro* ChAT-negativ sind (Tab. 8). Diese kultivierten monozytären Zellen wurden jedoch nicht stimuliert. Auch in der vorliegenden Arbeit wiesen durch Perfusion gewonnene mononukleäre Leukozyten aus dem isogenen Nierentransplantat (ca. 50 % der Leukozyten monozytär (59)) eine nur sehr geringe CHT1- und ChAT-Expression auf, obwohl letztere mit hochsensitiver nested-RT-

PCR untersucht wurden. Auch der ACh-Gehalt war sehr niedrig. Vermutlich produzieren Monozyten erst nach Stimulation nennenswerte ACh-Mengen.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass intravasale Monozyten Teil des extraneuronalen cholinergen Systems sein können. Es ergeben sich Hinweise, dass in Monozyten während starker immunologischer Aktivierung, wie der akuten Transplantatabstoßung, die Expression des ACh-Syntheseapparates deutlich erhöht wird, was nicht in Widerspruch zu bisherigen *in vitro*-Expressionsstudien steht. Dennoch ist es nach den in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht möglich, den direkten Beitrag der Monozyten und T-Lymphozyten zum Gesamtgehalt des ACh in intravasalen mononukleären Leukozyten aus Nierentransplantaten zu bestimmen. Eine Lösung dieser Frage könnte der Einsatz von *cell sortern* oder *magnetic beads* sein. Diese Methoden ermöglichen es, Monozyten aus der Population der intravasalen, mononukleären Leukozyten mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren. Während der relativ langen Aufreinigungsprozeduren könnte es jedoch zu Veränderungen des intrazellulären ACh-Gehaltes kommen, was die Ergebnisse verfälschen würde.

4.6 Hypothesen zur immunologischen Funktion leukozytären Azetylcholins

Es stellt sich die Frage, welche Funktionen intravasal sezerniertes ACh entfalten kann. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ACh kommen als potenzielle Zielzellen für leukozytäres ACh v.a. intravasale Leukozyten und Endothelzellen in Frage. Für beide Zellpopulationen ist bekannt, dass sie sowohl nikotinische, als auch muskarinische ACh-Rezeptoren exprimieren (51, 130, 139, 143).

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Effekt von cholinergen Agonisten wesentlich vom Rezeptorsubtyp der Zielzellen abhängt und z.T. gegensätzlich sein kann (22, 23, 36, 65, 177). Wie in der Einleitung beschrieben, kommen – vereinfacht gesagt – muskarinischen Rezeptoren eine eher proinflammatorische Funktion zu (177), während über nikotinische Rezeptoren als Teil des “cholinergen antiinflammatorischen Pfades” (14) eher antiinflammatorische Wirkungen erzielt werden. Von den Wirkungen, die über diese Oberflächenrezeptoren übermittelt werden, wird in der aktuellen Literatur der antiinflammatorischen Wirkung über den $\alpha 7$ nAChR die größte Beachtung geschenkt (vgl. 1.3.3.3). Die antiinflammatorische Wirkung von nikotinischen Agonisten bzw. vagaler Stimulation ist schon *in vivo* bestätigt worden: Antiinflammatorische Effekte von Nikotin sind für die LPS-induzierte

Toxikämie, die Sanarelli-Schwartzman-Reaktion, Peritonitis, Pankreatitis und den renalen Ischämie-Reperfusionsschaden experimentell belegt (136, 137, 160, 161, 165). *In vitro*-Experimente zeigten außerdem, dass nikotinische Agonisten durch verminderte IL-12-Sekretion aus Alveolarmakrophagen die für die Transplantatabstoßung bedeutsame Th1-Antwort hemmen können (104). Ob ACh während der akuten Transplantatabstoßung antiinflammatorischen Einfluss auf Monozyten nimmt, ist noch unklar und Gegenstand weiterer Studien. Für eine immunsuppressive Wirkung von ACh bzw. Nikotin auf die Monozyten spricht, dass Nikotin bei Leukozyten monozytären Ursprungs wie Makrophagen (14, 65, 149) und monozytären dendritischen Zellen (112) antiinflammatorische Wirkungen entfaltet.

In Untersuchungen der nAChR-mRNA-Expression mittels PCR im Tiermodell dieser Arbeit konnten die $\alpha 5$ -, $\alpha 9$ -, $\alpha 10$ - und $\beta 2$ -nAChR-Untereinheiten sowohl in Proben aus isogenen, als auch aus allogenen Nierentransplantaten nachgewiesen werden, wobei allein die Expression der $\beta 2$ -nAChR-Untereinheit im Rahmen der Abstoßungsreaktion herunterreguliert wurde (70). In mononukleären Leukozyten aus den Gefäßen isogener und allogener Nierentransplantate scheiterte der Nachweis von $\alpha 7$ -nAChR-mRNA (70). Diese Ergebnisse widersprechen *in vitro*-Studien an humanen Monozyten, die diese als $\alpha 7$ -nAChR⁺-Zellen identifizieren. Nikotin bewirkt hier durch Suppression der I- κ B-Phosphorylierung einen antiinflammatorischen Effekt (176), jedoch nehmen Monozyten grundsätzlich *in vitro* eine makrophagenähnliche Morphologie an. Dass Makrophagen $\alpha 7$ -nAChR⁺ sind, ist bekannt. Bei Untersuchung der Monozyten sind deshalb grundsätzlich *in vivo*- bzw. *ex vivo*-Experimente zu bevorzugen. (vgl. 1.3.3.2).

Die *in vitro* kultivierten mononukleären Leukozyten aus allogenen Nierentransplantaten zeigten nach Nikotinapplikation keinen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (70). Eine ATP-induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde allerdings durch Zugabe des $\alpha 7/8/9$ -Antagonist Methylllycaconitin verstärkt (70). Neben einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration bewirkt ATP auch eine erhöhte cAMP-Konzentration in humanen Monozyten, was die Wanderung der Monozyten in das Transplantat bewirken kann (84). Somit könnte eine Erhöhung des non-neuronalen, intravasalen ACh-Spiegels durch verstärkte Infiltratbildung und intravasale Monozytenakkumulation proinflammatorisch wirken. In Studien konnte ATP zwar als proinflammatorisches *danger signal* herausgearbeitet werden (55, 124), könnte aber als Teil einer negativen Rückkopplungsschleife auch anti-inflammatorische Wirkungen entfalten (84). Die Wirkungen non-

neuronalen AChs im Gefäßkompartiment allogener Nierentransplantate müssen somit Gegenstand weiterer Studien sein.

Für Lymphozyten und Endothelzellen sind bereits antiinflammatorische Effekte bekannt, die leukozytäres ACh im Gefäßkompartiment entfalten könnte: Saed et al. konnten in Tiermodellen zeigen, dass cholinerge Agonisten die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Aktivierung von Endothelzellen hemmen und zu verminderter Migration von Leukozyten in das Interstitium führen (137). Auf diese Arbeit bezogen, könnte leukozytäres ACh wichtige Wirkungen auf die Entwicklung leukozyitärer Infiltrate in allogenen Nierentransplantaten haben. Für Lymphozyten ist bekannt, dass das Expressionsmuster ihrer AChR-Subtypen vom Status ihrer immunologischen Aktivierung abhängt (130). Welche Wirkungen ACh auf Lymphozyten entfaltet, muss in weiteren Studien untersucht werden: Intravasales ACh könnte die in unmittelbarer Umgebung gelegenen Lymphozyten via nAChR in ihrer Aktivität bremsen (145), während es über mAChR auch proinflammatorische Effekte in Lymphozyten hervorrufen könnte (177). Während der akuten Transplantatabstoßung könnte ACh, das massiv aktivierten mononukleären Leukozyten entstammt, intravasal benachbarte T-Lymphozyten über mAChR aktivieren, andererseits aber über nAChR hemmen (82).

4.8 Schlußfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *in vivo* intravasale mononukleäre Leukozyten allogener Nierentransplantate während der akuten Abstoßung ACh produzieren. Es muss angenommen werden, dass Monozyten cholinerg sind und Quellen intravasalen AChs darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass ACh autokrin oder parakrin benachbarte Zellen reguliert. Als potentielle Zielzellen kommen hierfür Endothelzellen, Lymphozyten und Monozyten in Betracht. Die Arbeit zeigt, dass ACh nicht nur als neuronal sezernierter Botenstoff angesehen werden darf, sondern auch als Mediator von Blutleukozyten. Die Literatur zu den Wirkungen von ACh auf das Immunsystem legt nahe, dass non-neuronal sezerniertes ACh während der akuten Abstoßungsreaktion eine wichtige regulatorische Funktion im Gefäßkompartiment wahrnimmt. Funktionelle Studien müssen folgen, um die Rolle von intravasalem ACh zu klären. Ein erster Schritt wäre sicherlich die Analyse der zellspezifischen AChR-Expressionsmuster von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen während der experimentellen Nierentransplantation in der Ratte.

Diese Arbeit zeigt, dass Immunreaktionen im Gefäß des Transplantates durch ACh unabhängig vom Nervensystem moduliert werden können. Für eine potentiell pharmakologische Nutzung des non-neuronalen, cholinergen Systems in der Transplantationsimmunologie, kann die im allogenen Nierentransplantat erhöhte ACh-Synthese ein Ansatzpunkt sein, mittels mAChR-Antagonisten muskarinische Effekte zu hemmen oder durch Steigerung der nikotinschen Effekte (nAChR-Agonisten) die intravasale Aktivierung mononukleärer Leukozyten zu dämpfen. Bei jeglicher pharmakologischer Nutzung des cholinergen Systems auch bei anderen Krankheitsbildern muss die Eigensynthese von ACh durch aktivierte mononukleäre Leukozyten berücksichtigt werden.

5 Literatur

1. **Abdallah AN, Billes MA, Attia Y, Doutremepuich C, Cassaigne A, and Iron A.** Evaluation of plasma levels of tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 as rejection markers in a cohort of 142 heart-grafted patients followed by endomyocardial biopsy. *Eur Heart J* 18: 1024-1029, 1997.
2. **Auchincloss H, Jr., Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, and Glimcher LH.** The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3373-3377, 1993.
3. **Bellier JP and Kimura H.** Acetylcholine synthesis by choline acetyltransferase of a peripheral type as demonstrated in adult rat dorsal root ganglion. *J Neurochem* 101: 1607-1618, 2007.
4. **Benishin CG and Carroll PT.** Acetylation of choline and homocholine by membrane-bound choline-O-acetyltransferase in mouse forebrain nerve endings. *J Neurochem* 36: 732-740, 1981.
5. **Berrard S, Brice A, Lottspeich F, Braun A, Barde YA, and Mallet J.** cDNA cloning and complete sequence of porcine choline acetyltransferase: in vitro translation of the corresponding RNA yields an active protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9280-9284, 1987.
6. **Berse B and Blusztajn JK.** Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem* 270: 22101-22104, 1995.
7. **Berse B and Blusztajn JK.** Modulation of cholinergic locus expression by glucocorticoids and retinoic acid is cell-type specific. *FEBS Lett* 410: 175-179, 1997.
8. **Berse B, Lopez-Coviella I, and Blusztajn JK.** Activation of TrkA by nerve growth factor upregulates expression of the cholinergic gene locus but attenuates the response to ciliary neurotrophic growth factor. *Biochem J* 342 (Pt 2): 301-308, 1999.
9. **Biedermann BC and Pober JS.** Human vascular endothelial cells favor clonal expansion of unusual alloreactive CTL. *J Immunol* 162: 7022-7030, 1999.
10. **Birks RI and Macintosh FC.** Acetylcholine metabolism at nerve-endings. *Br Med Bull* 13: 157-161, 1957.
11. **Blusztajn JK, Venturini A, Jackson DA, Lee HJ, and Wainer BH.** Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. *J Neurosci* 12: 793-799, 1992.
12. **Bogdan C, Rollinghoff M, and Diefenbach A.** The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17-26, 2000.
13. **Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD, Kampinga J, and Bradley JA.** Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med* 169: 1931-1946, 1989.
14. **Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, and Tracey KJ.** Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405: 458-462, 2000.
15. **Brice A, Berrard S, Raynaud B, Ansieau S, Coppola T, Weber MJ, and Mallet J.** Complete sequence of a cDNA encoding an active rat choline acetyltransferase: a tool to investigate the plasticity of cholinergic phenotype expression. *J Neurosci Res* 23: 266-273, 1989.
16. **Buelow R, Mercier I, Glanville L, Regan J, Ellingson L, Janda G, Claas F, Colombe B, Gelder F, Grosse-Wilde H, and et al.** Detection of panel-reactive anti-HLA class I

- antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay or lymphocytotoxicity. Results of a blinded, controlled multicenter study. *Hum Immunol* 44: 1-11, 1995.
17. **Castell X, Cheviron N, Barnier JV, and Diebler MF.** Exploring the regulation of the expression of ChAT and VACHT genes in NG108-15 cells: implication of PKA and PI3K signaling pathways. *Neurochem Res* 28: 557-564, 2003.
 18. **Cecka JM.** The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl*: 1-16.
 19. **Chalimoniuk M, King-Pospisil K, Pedersen WA, Malecki A, Wylegala E, Mattson MP, Hennig B, and Toborek M.** Arachidonic acid increases choline acetyltransferase activity in spinal cord neurons through a protein kinase C-mediated mechanism. *J Neurochem* 90: 629-636, 2004.
 20. **Chiocchetti R, Poole DP, Kimura H, Aimi Y, Robbins HL, Castelucci P, and Furness JB.** Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. *Cell Tissue Res* 311: 11-22, 2003.
 21. **Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N, and Sexton PM.** Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem* 278: 3293-3297, 2003.
 22. **Cloez-Tayarani I and Changeux JP.** Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *J Leukoc Biol* 81: 599-606, 2007.
 23. **Cooke JP.** Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci* 80: 2347-2351, 2007.
 24. **Cooke LJ and Rylett RJ.** Inhibitors of serine/threonine phosphatases increase membrane-bound choline acetyltransferase activity and enhance acetylcholine synthesis. *Brain Res* 751: 232-238, 1997.
 25. **Dausset J.** The major histocompatibility complex in man. *Science* 213: 1469-1474, 1981.
 26. **Dengler TJ, Johnson DR, and Pober J.** Endothelial-cell selective CTL arise from limited precursor subsets of alloreactive CD8⁺ T cells and show reduced clonal expansion. *J Heart Lung Transplant* 20: 171-172, 2001.
 27. **Dengler TJ, Johnson DR, and Pober JS.** Human vascular endothelial cells stimulate a lower frequency of alloreactive CD8⁺ pre-CTL and induce less clonal expansion than matching B lymphoblastoid cells: development of a novel limiting dilution analysis method based on CFSE labeling of lymphocytes. *J Immunol* 166: 3846-3854, 2001.
 28. **Dengler TJ and Pober JS.** Human vascular endothelial cells stimulate memory but not naive CD8⁺ T cells to differentiate into CTL retaining an early activation phenotype. *J Immunol* 164: 5146-5155, 2000.
 29. **Denton MD, Geehan CS, Alexander SI, Sayegh MH, and Briscoe DM.** Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. *J Exp Med* 190: 555-566, 1999.
 30. **Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, and Kraal G.** The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54: 589-599, 1985.
 31. **Dobransky T, Davis WL, and Rylett RJ.** Functional characterization of phosphorylation of 69-kDa human choline acetyltransferase at serine 440 by protein kinase C. *J Biol Chem* 276: 22244-22250, 2001.
 32. **Dobransky T, Davis WL, Xiao GH, and Rylett RJ.** Expression, purification and characterization of recombinant human choline acetyltransferase: phosphorylation of the enzyme regulates catalytic activity. *Biochem J* 349: 141-151, 2000.
 33. **Dobransky T, Doherty-Kirby A, Kim AR, Brewer D, Lajoie G, and Rylett RJ.** Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate human choline acetyltransferase regulating its catalytic activity. *J Biol Chem* 279: 52059-52068, 2004.

34. **Doukas J and Pober JS.** IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J Immunol* 145: 1727-1733, 1990.
35. **Eder-Colli L, Amato S, and Froment Y.** Amphiphilic and hydrophilic forms of choline-O-acetyltransferase in cholinergic nerve endings of the Torpedo. *Neuroscience* 19: 275-287, 1986.
36. **Eglen RM.** Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 26: 219-233, 2006.
37. **Espinos E, Le Van Thai A, Pomies C, and Weber MJ.** Cooperation between phosphorylation and acetylation processes in transcriptional control. *Mol Cell Biol* 19: 3474-3484, 1999.
38. **Fabre J, Lim SH, and Morris PJ.** Renal transplantation in the rat: details of a technique. *Aust N Z J Surg* 41: 69-75, 1971.
39. **Fangmann J, Dalchau R, Sawyer GJ, Priestley CA, and Fabre JW.** T cell recognition of donor major histocompatibility complex class I peptides during allograft rejection. *Eur J Immunol* 22: 1525-1530, 1992.
40. **Feldmann M.** Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2: 364-371, 2002.
41. **Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, and Kornfeld H.** Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 65: 5149-5156, 1997.
42. **Ferguson SM, Savchenko V, Apparsundaram S, Zwick M, Wright J, Heilman CJ, Yi H, Levey AI, and Blakely RD.** Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J Neurosci* 23: 9697-9709, 2003.
43. **Ferrero P, Rocca P, Eva C, Benna P, Rebaudengo N, Ravizza L, Genazzani E, and Bergamasco B.** An analysis of lymphocyte 3H-N-methyl-scopolamine binding in neurological patients. Evidence of altered binding in Alzheimer's disease. *Brain* 114 (Pt 4): 1759-1770, 1991.
44. **Finocchiaro G, Taroni F, Rocchi M, Martin AL, Colombo I, Tarelli GT, and DiDonato S.** cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 661-665, 1991.
45. **Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, McBain CJ, and Wess J.** Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron* 33: 615-624, 2002.
46. **Fujii T and Kawashima K.** Calcium signaling and c-Fos gene expression via M3 muscarinic acetylcholine receptors in human T- and B-cells. *Jpn J Pharmacol* 84: 124-132, 2000.
47. **Fujii T, Tajima S, Yamada S, Watanabe Y, Sato KZ, Matsui M, Misawa H, Kasahara T, and Kawashima K.** Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines. *Neurosci Lett* 259: 71-74, 1999.
48. **Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, and Kawashima K.** Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44: 66-72, 1996.
49. **Fujii T, Yamada S, Watanabe Y, Misawa H, Tajima S, Fujimoto K, Kasahara T, and Kawashima K.** Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *J Neuroimmunol* 82: 101-107, 1998.
50. **Fujimoto K, Matsui M, Fujii T, and Kawashima K.** Decreased acetylcholine content and choline acetyltransferase mRNA expression in circulating mononuclear leukocytes and lymphoid organs of the spontaneously hypertensive rat. *Life Sci* 69: 1629-1638, 2001.

51. **Fujino H, Kitamura Y, Yada T, Uehara T, and Nomura Y.** Stimulatory roles of muscarinic acetylcholine receptors on T cell antigen receptor/CD3 complex-mediated interleukin-2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Mol Pharmacol* 51: 1007-1014, 1997.
52. **Fyfe AI, Stevenson LW, Harper CM, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM, and Berliner JA.** Recipient mononuclear cell recognition and adhesion to graft endothelium after human cardiac transplantation. Lymphocyte recognition leads to monocyte adhesion. *J Clin Invest* 94: 2142-2147, 1994.
53. **Gasser M, Waaga AM, Kist-Van Holthe JE, Lenhard SM, Laskowski I, Shaw GD, Hancock WW, and Tilney NL.** Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol* 13: 1937-1945, 2002.
54. **Gates J, Jr., Ferguson SM, Blakely RD, and Apparsundaram S.** Regulation of choline transporter surface expression and phosphorylation by protein kinase C and protein phosphatase 1/2A. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 536-545, 2004.
55. **Gavala M, Pfeiffer ZA, Bertics PJ.** The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells. *J Leukocyte Biol* Epub ahead of print, 2008.
56. **Govindasamy L, Pedersen B, Lian W, Kukar T, Gu Y, Jin S, Agbandje-McKenna M, Wu D, and McKenna R.** Structural insights and functional implications of choline acetyltransferase. *J Struct Biol* 148: 226-235, 2004.
57. **Gracie JA, Bolton EM, Porteous C, and Bradley JA.** T cell requirements for the rejection of renal allografts bearing an isolated class I MHC disparity. *J Exp Med* 172: 1547-1557, 1990.
58. **Grau V, Herbst B, and Steiniger B.** Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell Tissue Res* 291: 117-126, 1998.
59. **Grau V, Stehling O, Garn H, and Steiniger B.** Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation* 71: 37-46, 2001.
60. **Grau V, Wilker S, Lips KS, Hartmann P, Rose F, Padberg W, Fehrenbach H, Wessler I, and Kummer W.** Administration of keratinocyte growth factor down-regulates the pulmonary capacity of acetylcholine production. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1955-1963, 2007.
61. **Grisk O, Grone HJ, Rose HJ, and Rettig R.** Sympathetic reinnervation of rat kidney grafts. *Transplantation* 72: 1153-1155, 2001.
62. **Haberberger RV, Pfeil U, Lips KS, and Kummer W.** Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol* 119: 943-948, 2002.
63. **Habert E, Birman S, and Mallet J.** High-level synthesis and fate of acetylcholine in baculovirus-infected cells: characterization and purification of recombinant rat choline acetyltransferase. *J Neurochem* 58: 1447-1453, 1992.
64. **Haga T and Noda H.** Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 291: 564-575, 1973.
65. **Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, Yoshino T, Nishibori M, and Tanaka N.** Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock* 26: 358-364, 2006.
66. **Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia K, King JA, Smiley ST, Ling M, Gerard NP, and Gerard C.** Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 192: 1515-1520, 2000.

67. **Hancock WW, Thomson NM, and Atkins RC.** Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation* 35: 458-463, 1983.
68. **Harlan JM and Winn RK.** Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med* 30: S214-219, 2002.
69. **Hebert TE and Bouvier M.** Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol* 76: 1-11, 1998.
70. **Hecker A, Mikulski Z, Lips KS, Pfeil U, Zakrzewicz A, Wilker S, Hartmann P, Padberg W, Wessler I, Kummer W, Grau V.** Pivotal advance: Upregulation of acetylcholine synthesis and paracrine cholinergic signalling in intravascular transplant leukocytes during rejection of rat renal allografts. *J Leukocyte Biol* Epub ahead of print, 2009.
71. **Horuk R, Shurey S, Ng HP, May K, Bauman JG, Islam I, Ghannam A, Buckman B, Wei GP, Xu W, Liang M, Rosser M, Dunning L, Hesselgesser J, Snider RM, Morrissey MM, Perez HD, and Green C.** CCR1-specific non-peptide antagonist: efficacy in a rabbit allograft rejection model. *Immunol Lett* 76: 193-201, 2001.
72. **Hosey MM, Pals-Rylaarsdam R, Lee KB, Roseberry AG, Benovic JL, Gurevich VV, and Bunemann M.** Molecular events associated with the regulation of signaling by M2 muscarinic receptors. *Life Sci* 64: 363-368, 1999.
73. **Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, and Murphy KM.** Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260: 547-549, 1993.
74. **Hubé F RP, Iochmann S, Gruel Y** Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. *Mol Biotechnol* 31(1): 81-84, 2005.
75. **Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punz A, Mueller M, Afkhampour K, Mittlboeck M, Losert U, Polterauer P, Roth E, Patton S, and Malinski T.** L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 96: 667-675, 1997.
76. **Ishii K, Oda Y, Ichikawa T, and Deguchi T.** Complementary DNAs for choline acetyltransferase from spinal cords of rat and mouse: nucleotide sequences, expression in mammalian cells, and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 7: 151-159, 1990.
77. **Issa AM, Gauthier S, and Collier B.** Effects of the phosphatase inhibitors calyculin A and okadaic acid on acetylcholine synthesis and content of rat hippocampal formation. *J Neurochem* 66: 1924-1932, 1996.
78. **Jindal RM and Hariharan S.** Chronic rejection in kidney transplants. An in-depth review. *Nephron* 83: 13-24, 1999.
79. **Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, and Kim HK.** Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 21: 1231-1239, 2006.
80. **Johnson GJ, Cosnes J, and Mansfield JC.** Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 21: 921-931, 2005.
81. **Jose MD, Ikezumi Y, van Rooijen N, Atkins RC, and Chadban SJ.** Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 76: 1015-1022, 2003.
82. **Kalra R, Singh SP, Pena-Philippides JC, Langley RJ, Razani-Boroujerdi S, and Sopori ML.** Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of nicotine administered by patch in an animal model. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 563-568, 2004.
83. **Kao KJ, Scornik JC, and Small SJ.** Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies--an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 55: 192-196, 1993.

84. **Kaufmann A, Musset B, Limberg SH, Renigunta V, Sus R, Dalpke AH, Heeg KM, Robaye B, Hanley PJ.** "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem* 280: 32459-32467, 2005.
85. **Kawashima K and Fujii T.** Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* 9: 2063-2085, 2004.
86. **Kawashima K and Fujii T.** The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci* 72: 2101-2109, 2003.
87. **Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, and Misawa H.** Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci* 80: 2314-2319, 2007.
88. **Kengaku M, Misawa H, and Deguchi T.** Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 71-76, 1993.
89. **Kimura H, McGeer PL, Peng F, and McGeer EG.** Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* 208: 1057-1059, 1980.
90. **Kimura H, McGeer PL, Peng JH, and McGeer EG.** The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J Comp Neurol* 200: 151-201, 1981.
91. **Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, and Wessler I.** Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesised by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 515-523, 1997.
92. **Koga S, Novick AC, Toma H, and Fairchild RL.** CD8+ T cells produce RANTES during acute rejection of murine allogeneic skin grafts. *Transplantation* 67: 854-864, 1999.
93. **Kuhar MJ and Murrin LC.** Sodium-dependent, high affinity choline uptake. *J Neurochem* 30: 15-21, 1978.
94. **Kummer W, Lips KS, Pfeil U.** The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130: 219-234, 2008.
95. **Kutukculer N, Shenton BK, Clark K, Rigg KM, Forsythe JL, Kirby JA, Proud G, and Taylor RM.** Renal allograft rejection: the temporal relationship and predictive value of plasma TNF (alpha and beta), IFN-gamma and soluble ICAM-1. *Transpl Int* 8: 45-50, 1995.
96. **Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, and Van Furth R.** IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 148: 568-574, 1992.
97. **Laskowska-Bozek H, Bany U, Burakowski T, Janiak R, Lewartowski B, and Ryzewski J.** Effect of cholinergic stimulation on free intracellular Ca²⁺ concentration in human lymphocytes. *Neuroimmunomodulation* 3: 247-253, 1996.
98. **Lips KS, Pfeil U, Reiners K, Rimasch C, Kuchelmeister K, Braun-Dullaeus RC, Haberberger RV, Schmidt R, and Kummer W.** Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries. *J Histochem Cytochem* 51: 1645-1654, 2003.
99. **Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Wessler I, Schwantes U, Koepsell H, and Kummer W.** Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51: 1042-1053, 2007.
100. **Liu Z, Braunstein NS, and Suciu-Foca N.** T cell recognition of allopeptides in context of syngeneic MHC. *J Immunol* 148: 35-40, 1992.
101. **Lockman PR and Allen DD.** The transport of choline. *Drug Dev Ind Pharm* 28: 749-771, 2002.

102. **Lopez-Coviella I, Berse B, Thies RS, and Blusztajn JK.** Upregulation of acetylcholine synthesis by bone morphogenetic protein 9 in a murine septal cell line. *J Physiol Paris* 96: 53-59, 2002.
103. **Lwaleed BA, Bass PS, and Cooper AJ.** The biology and tumour-related properties of monocyte tissue factor. *J Pathol* 193: 3-12, 2001.
104. **Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, and Yamamoto Y.** Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol* 167: 6518-6524, 2001.
105. **Matsuo A, Bellier JP, Hisano T, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Saito N, and Kimura H.** Rat choline acetyltransferase of the peripheral type differs from that of the common type in intracellular translocation. *Neurochem Int* 46: 423-433, 2005.
106. **Mellott T, Lopez-Coviella I, Blusztajn JK, and Berse B.** Mitogen-activated protein kinase kinase negatively modulates ciliary neurotrophic factor-activated choline acetyltransferase gene expression. *Eur J Biochem* 269: 850-858, 2002.
107. **Misawa H, Ishii K, and Deguchi T.** Gene expression of mouse choline acetyltransferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. *J Biol Chem* 267: 20392-20399, 1992.
108. **Misawa H, Takahashi R, and Deguchi T.** Coordinate expression of vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic superior cervical neurones. *Neuroreport* 6: 965-968, 1995.
109. **Nachmansohn D MA.** The formation of acetylcholine. A new enzyme choline acetylase. *J Neurophysiol* 6: 397-403, 1943.
110. **Nakanishi Y, Tooyama I, Yasuhara O, Aimi Y, Kitajima K, and Kimura H.** Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase of a peripheral type in the rat larynx. *J Chem Neuroanat* 17: 21-32, 1999.
111. **Nomura J, Hosoi T, Okuma Y, and Nomura Y.** The presence and functions of muscarinic receptors in human T cells: the involvement in IL-2 and IL-2 receptor system. *Life Sci* 72: 2121-2126, 2003.
112. **Nouri-Shirazi M and Guinet E.** Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. *Immunology* 109: 365-373, 2003.
113. **Oda Y.** Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 49: 921-937, 1999.
114. **Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, and Katsura I.** Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 3: 120-125, 2000.
115. **Okuda T, Okamura M, Kaitsuka C, Haga T, and Gurwitz D.** Single nucleotide polymorphism of the human high affinity choline transporter alters transport rate. *J Biol Chem* 277: 45315-45322, 2002.
116. **Patel R and Terasaki PI.** Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 280: 735-739, 1969.
117. **Pavlov V, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ.** The Cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med* 9: 125-134, 2003.
118. **Pedersen WA, Berse B, Schuler U, Wainer BH, and Blusztajn JK.** All-trans- and 9-cis-retinoic acid enhance the cholinergic properties of a murine septal cell line: evidence that the effects are mediated by activation of retinoic acid receptor- α . *J Neurochem* 65: 50-58, 1995.
119. **Pedersen WA and Blusztajn JK.** Characterization of the acetylcholine-reducing effect of the amyloid-beta peptide in mouse SN56 cells. *Neurosci Lett* 239: 77-80, 1997.

120. **Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, and Terasaki PI.** Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol* 60: 1293-1302, 1999.
121. **Pei R, Wang G, Tarsitani C, Rojo S, Chen T, Takemura S, Liu A, and Lee J.** Simultaneous HLA Class I and Class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol* 59: 313-322, 1998.
122. **Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, and Kummer W.** Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 473-477, 2003.
123. **Pfeil U, Vollerthun R, Kummer W, and Lips KS.** Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta. *Histochem Cell Biol* 122: 121-130, 2004.
124. **Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A.** ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8067-8072, 2008.
125. **Pober JS and Cotran RS.** The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50: 537-544, 1990.
126. **Pongrac JL and Rylett RJ.** Differential effects of nerve growth factor on expression of choline acetyltransferase and sodium-coupled choline transport in basal forebrain cholinergic neurons in culture. *J Neurochem* 66: 804-810, 1996.
127. **Puddu P, Fantuzzi L, Borghi P, Varano B, Rainaldi G, Guillemard E, Malorni W, Nicaise P, Wolf SF, Belardelli F, and Gessani S.** IL-12 induces IFN- γ expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 159: 3490-3497, 1997.
128. **Quirin-Stricker C, Mauvais C, and Schmitt M.** Transcriptional activation of human choline acetyltransferase by AP2- and NGF-induced factors. *Brain Res Mol Brain Res* 49: 165-174, 1997.
129. **Rabey JM, Grynberg E, and Graff E.** Changes of muscarinic cholinergic binding by lymphocytes in Parkinson's disease with and without dementia. *Ann Neurol* 30: 847-850, 1991.
130. **Ricci A, Amenta F, Bronzetti E, Mannino F, Mariotta S, and Tayebati SK.** Expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptor subtypes in airway hyperresponsiveness. *J Neuroimmunol* 129: 178-185, 2002.
131. **Richards MH and van Giersbergen PL.** Differences in agonist potency ratios at human m1 muscarinic receptors expressed in A9L and CHO cells. *Life Sci* 57: 397-402, 1995.
132. **Rinner I, Felsner P, Falus A, Skreiner E, Kukulansky T, Globerson A, Hirokawa K, and Schauenstein K.** Cholinergic signals to and from the immune system. *Immunol Lett* 44: 217-220, 1995.
133. **Rinner I, Kawashima K, and Schauenstein K.** Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. *J Neuroimmunol* 81: 31-37, 1998.
134. **Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S, and Tracey KJ.** Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11008-11013, 2008.
135. **Rossier J.** Acetyl-coenzyme A and coenzyme A analogues. Their effects on rat brain choline acetyltransferase. *Biochem J* 165: 321-326, 1977.
136. **Sadis C, Teske G, Stokman G, Kujak C, Claessen N, Moore F, Loi P, Diallo B, Barvais L, Goldman M, Florquin S, and Le Moine A.** Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *PLoS ONE* 2: e469, 2007.
137. **Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y, and Metz CN.** Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* 201: 1113-1123, 2005.

138. **Salvaterra PM and McCaman RE.** Choline acetyltransferase and acetylcholine levels in *Drosophila melanogaster*: a study using two temperature-sensitive mutants. *J Neurosci* 5: 903-910, 1985.
139. **Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F, and Kawashima K.** Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett* 266: 17-20, 1999.
140. **Shimojo M, Wu D, and Hersh LB.** The cholinergic gene locus is coordinately regulated by protein kinase A II in PC12 cells. *J Neurochem* 71: 1118-1126, 1998.
141. **Shoskes DA and Wood KJ.** Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 15: 32-38, 1994.
142. **Siesjo BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjo P, Katsura K, and Folbergrova J.** Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg* 59: 1316-1320, 1995.
143. **Skok MV, Kalashnik EN, Koval LN, Tsetlin VI, Utkin YN, Changeux JP, and Grailhe R.** Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines. *Mol Pharmacol* 64: 885-889, 2003.
144. **Snell GD.** Studies in histocompatibility. *Science* 213: 172-178, 1981.
145. **Sopori ML, Kozak W, Savage SM, Geng Y, and Kluger MJ.** Nicotine-induced modulation of T Cell function. Implications for inflammation and infection. *Adv Exp Med Biol* 437: 279-289, 1998.
146. **Soudijn W, van Wijngaarden I, and AP IJ.** Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5: 749-755, 2002.
147. **Stehling O, Grau V, and Steiniger B.** Monocyte cytotoxicity during acute kidney graft rejection in rats. *Int Immunol* 16: 101-110, 2004.
148. **Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, and Turka LA.** Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 166: 973-981, 2001.
149. **Takahashi HK, Iwagaki H, Hamano R, Yoshino T, Tanaka N, and Nishibori M.** Effect of nicotine on IL-18-initiated immune response in human monocytes. *J Leukoc Biol* 80: 1388-1394, 2006.
150. **Tandon A, Bachoo M, Weldon P, Polosa C, and Collier B.** Effects of colchicine application to preganglionic axons on choline acetyltransferase activity and acetylcholine content and release in the superior cervical ganglion. *J Neurochem* 66: 1033-1041, 1996.
151. **Tayebati SK, Amenta F, Amici S, El-Assouad D, Gallai V, Ricci A, and Parnetti L.** Peripheral blood lymphocytes muscarinic cholinergic receptor subtypes in Alzheimer's disease: a marker of cholinergic dysfunction? *J Neuroimmunol* 121: 126-131, 2001.
152. **Terasaki PI, Vredevoe DL, Porter KA, Mickey MR, Marchioro TL, Faris TD, Herrmann TJ, and Starzl TE.** Serotyping for homotransplantation. V. Evaluation of a matching scheme. *Transplantation* 4: 688-699, 1966.
153. **Tooyama I and Kimura H.** A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. *J Chem Neuroanat* 17: 217-226, 2000.
154. **Tracey KJ.** The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859, 2002.
155. **Traiffort E, Ruat M, O'Regan S, and Meunier FM.** Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. *J Neurochem* 92: 1116-1125, 2005.
156. **Tucek S.** The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322: 53-69, 1982.

157. **Valujskikh A, Matesic D, Gilliam A, Anthony D, Haqqi TM, and Heeger PS.** T cells reactive to a single immunodominant self-restricted allopeptide induce skin graft rejection in mice. *J Clin Invest* 101: 1398-1407, 1998.
158. **van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, and Schmid SL.** Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122: 553-563, 1993.
159. **Van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, and Dijkstra CD.** Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 260: 215-222, 1990.
160. **van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, Tracey KJ, and van der Poll T.** The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 130: 1822-1830, 2006.
161. **van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, and van der Poll T.** The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis* 191: 2138-2148, 2005.
162. **Vos IH and Briscoe DM.** Endothelial injury: cause and effect of alloimmune inflammation. *Transpl Infect Dis* 4: 152-159, 2002.
163. **Waaga AM, Gasser M, Laskowski I, and Tilney NL.** Mechanisms of chronic rejection. *Curr Opin Immunol* 12: 517-521, 2000.
164. **Wang CY, Naka Y, Liao H, Oz MC, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, and Pinsky DJ.** Cardiac graft intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and interleukin-1 expression mediate primary isograft failure and induction of ICAM-1 in organs remote from the site of transplantation. *Circ Res* 82: 762-772, 1998.
165. **Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, and Ulloa L.** Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 10: 1216-1221, 2004.
166. **Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, and Tracey KJ.** Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421: 384-388, 2003.
167. **Wei RQ, Schwartz CF, Lin H, Chen GH, and Bolling SF.** Anti-TNF antibody modulates cytokine and MHC expression in cardiac allografts. *J Surg Res* 81: 123-128, 1999.
168. **Weinberg JB.** Nitric oxide as an inflammatory mediator in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 5: 1131-1137, 1998.
169. **Wessler I, Kirkpatrick CJ.** The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 14: 423-434, 2001.
170. **Wessler I, Kirkpatrick CJ, and Racke K.** Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59-79, 1998.
171. **White HL and Wu JC.** Choline and carnitine acetyltransferases of heart. *Biochemistry* 12: 841-846, 1973.
172. **Wright EM and Turk E.** The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 447: 510-518, 2004.
173. **Wu D and Hersh LB.** Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J Neurochem* 62: 1653-1663, 1994.
174. **Xu H, Dhanireddy KK, and Kirk AD.** Human monocytes as intermediaries between allogeneic endothelial cells and allospecific T cells: a role for direct scavenger receptor-mediated endothelial membrane uptake in the initiation of alloimmunity. *J Immunol* 176: 750-761, 2006.

175. **Yasuhara O, Tooyama I, Aimi Y, Bellier JP, Hisano T, Matsuo A, Park M, and Kimura H.** Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase. *J Neurosci* 23: 2872-2881, 2003.
176. **Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, Kamochi H, and Suzuki N.** Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clin Exp Immunol* 146: 116-123, 2006.
177. **Zimring JC, Kapp LM, Yamada M, Wess J, and Kapp JA.** Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. *J Neuroimmunol* 164: 66-75, 2005.

6. Zusammenfassung

6.1. Während der akuten Abstoßung experimenteller Nierentransplantate wird die Azetylcholinsynthesemaschinerie intravasaler Leukozyten hochreguliert

In den Blutgefäßen allogener transplanterter Rattennieren akkumulieren während der Effektorphase der Abstoßung zahlreiche Leukozyten. Etwa 70 % dieser Zellen sind aktivierte zytotoxische Monozyten, die wahrscheinlich an der Zerstörung des allogenen Transplantates beteiligt sind. Azetylcholin (ACh) reguliert die proinflammatorische Aktivität von Monozyten/Makrophagen und spielt nach neusten Untersuchungen eine Schlüsselrolle bei neuroimmunologischen Interaktionen. Wegen seiner kurzen Halbwertszeit ist es jedoch fraglich, ob ACh neuronalen Ursprungs auf Blutleukozyten wirken kann.

In dieser Studie wurden isogene (LEW auf LEW) und allogene (DA auf LEW) Nierentransplantationen durchgeführt. Intravasale Leukozyten wurden aus den Blutgefäßen der Transplantate durch intensive Perfusion gewonnen und die Fraktion mononukleärer Leukozyten isoliert. Die Expression des hochaffinen Cholintransporters (CHT1) sowie der beiden Varianten der Cholinazetyltransferase (cChAT und pChAT) wurden mittels RT-PCR, Westernblot und Immunhistochemie analysiert. CHT1-, cChAT- und pChAT-exprimierende Monozyten wurden durch Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper ED1 nachgewiesen.

Intravasale Transplantatleukozyten exprimieren CHT1 und cChAT auf mRNA- und Proteinebene. Die mRNA- und Proteinexpression wird während der akuten Transplantatabstoßung drastisch hochreguliert. In Doppelfärbungen konnte die Expression von CHT1-, cChAT- und pChAT-Protein durch ED1⁺ Monozyten gezeigt werden. Die Messung des intrazellulären ACh-Gehaltes in intravasalen, mononukleären Leukozyten erfolgte mittels HPLC und ergab einen hochsignifikant erhöhten ACh-Gehalt in Leukozyten aus den Gefäßen allogener Nierentransplantate im Vergleich zu isogenen Nierentransplantaten.

Es wird damit zum ersten Mal gezeigt, dass intravasale Leukozyten, darunter Monozyten, während heftiger Immunreaktionen CHT1, cChAT und pChAT *in vivo* hochregulieren. Es ist davon auszugehen, dass ACh synthetisiert und freigesetzt wird. Die Daten implizieren, dass Monozyten cholinerg sind. Lokal produziertes nicht-neurales ACh fungiert wahrscheinlich als Mediator, der Immunreaktionen innerhalb von Blutgefäßen moduliert.

6.2 Acetylcholine synthesis machinery is upregulated in intravascular leukocytes during experimental renal allograft rejection

During acute rejection, large numbers of leukocytes accumulate in the blood vessels of experimental renal allografts. About 70 % of them are activated, cytotoxic monocytes which appear to be involved in allograft destruction. Acetylcholine (ACh) down-modulates pro-inflammatory functions of monocytes/macrophages and it has been proposed to be a key player in neuro-immunological interactions. Because of its short half-life, however, it is unlikely that neuronal acetylcholine affects blood leukocytes.

Renal transplantation was performed in the allogeneic DA to LEW and as a control in the isogeneic LEW to LEW rat strain combination. Intravascular leukocytes were harvested four days after transplantation and the expression of the high-affinity choline transporter (CHT1), common and peripheral choline acetyltransferase (cChAT and pChAT) was investigated by RT-PCR, immunoblotting and immunohistochemistry. Monocytes were identified in double-staining experiments with monoclonal antibody ED1. Intravascular graft leukocytes express CHT1 and cChAT mRNA and CHT1, cChAT and pChAT protein. The mRNA and protein expression is strongly up-regulated during acute allograft rejection. Immunohistochemical double-staining revealed CHT1, cChAT and pChAT protein expression by ED1⁺ monocytes. The intracellular concentration of acetylcholine was measured in intravascular graft leukocytes by HPLC. While almost no ACh could be detected in mononuclear leukocytes harvested from renal isografts, large amounts were detected in leukocytes from allografts.

We demonstrate for the first time that intravascular leukocytes, among them monocytes, up-regulate CHT1, cChAT and pChAT during fulminant immune reactions *in vivo* und demonstrate that ACh is produced. Hence, ACh is a mediator of intravascular leukocytes which might modulate immune reactions inside blood vessels.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Originalarbeiten

A. Hecker, A. Kaufmann, M. Hecker, W. Padberg, V. Grau: Expression of Interleukin-21, Interleukin-21 receptor and related type-1 cytokines by intravascular leukocytes during acute renal allograft rejection. *Immunobiology* 214(1): 41-9, 2009

A. Hecker, Z. Mikulski, K.S. Lips, U. Pfeil, A. Zakrzewicz, S. Wilker, P. Hartmann, W. Padberg, I. Wessler, W. Kummer, V. Grau: Pivotal advance: up-regulation of acetylcholine synthesis and paracrine cholinergic signalling in intravascular transplant leukocytes during rejection of rat renal allografts. *J Leuk Biol*: DOI:10.1189/jlb.1107722.

A. Hecker, M. Hirschburger, W. Padberg, BA Neubauer, A. Hahn: Operative treatment of gastro-esophageal reflux disease in patients with infantile Pompe's Disease: A case series. *Neuropediatrics* (unter Revision)

Zusammenfassungen von Vorträgen & Postern

A. Hecker, K.S. Lips, U. Pfeil, W. Kummer, W. Padberg, V. Grau: Peripheral choline acetyltransferase is expressed by monocytes and up-regulated during renal allograft rejection in rats. *Langenbeck's Archives of Surgery* 5: 462-3, 2005

A. Hecker, K.S. Lips, U. Pfeil, W. Kummer, A. Zakrzewicz, W. Padberg, V. Grau. Upregulation of high-affinity choline transporter (CHT1) and choline acetyltransferase (ChAT) gene expression by intravascular leukocytes during acute rejection of renal allografts. *Eur Surg Res* 38 (suppl 1): 23, 2006

A. Hecker, K.S. Lips, U. Pfeil, W. Kummer, W. Padberg, V. Grau. Peripheral Choline Acetyltransferase is expressed by monocytes and up-regulated during renal allograft rejection in rats. *Immunobiology* 210: 390-391, 2005

A. Hecker, K.S. Lips, U. Pfeil, W. Kummer, W. Padberg, V. Grau. Peripheral Choline Acetyltransferase is expressed by monocytes and up-regulated during renal allograft rejection in rats. *J Mol Neurosci* 30 (1-2): 23-4, 2006

8. Danksagung

Größter Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau zum einen für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, zum anderen für die stets herzliche, engagierte und geduldige Betreuung während der letzten fünf Jahre.

Des Weiteren bin ich Herrn Prof. Dr. W. Padberg sehr dankbar, mir neben wissenschaftlichem Arbeiten schon früh Einblicke in die chirurgische Klinik gewährt zu haben. Danke für die Möglichkeit auch in Zukunft neben klinischer Ausbildung auf transplantationsimmunologischer Ebene weiterarbeiten zu dürfen.

Außerdem gilt besonderer Dank Herrn Prof. Dr. W. Kummer aus dem Institut für Zellbiologie und Anatomie. Für die freundliche Kooperation und Integration in ein nettes Laborteam bin ich sehr dankbar. Namentlich sei Frau PD. Dr. K.S. Lips und Herrn Dr. U. Pfeil, sowie Petra Hartmann, Silke Wiegand und Martin Bodenbenner gedankt.

Für die sehr freundliche Kooperation möchte ich Herrn Prof. Dr. I. Wessler aus dem Institut für Pharmakologie der Universitätsklinik Mainz danken.

Ganz, ganz herzlich möchte ich mich bei dem Laborteam der Sektion experimentelle Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Thorax-, Viszeral-, Transplantations- und Kinderchirurgie bedanken, das mich über Jahre stets herzlich und freundlich begleitet hat. Sigrid Wilker, Renate Pläß, Petra Freitag, Gabriele Fuchs-Moll, Ulrike Berges und Katrin Petri sei an dieser Stelle mein ganz besonderer Dank gewidmet.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. M. Hirschburger für seine stets kameradschaftliche Unterstützung während meiner Arbeit danken, sowie dem gesamten Ärzteteam der Klinik für Allgemeinchirurgie.

Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern und Geschwistern, denen ich meinen beruflichen wie privaten Werdegang zu verdanken habe, sowie meiner Verlobten Birgit Pauli, die mich stets unterstützt und mein großer Rückhalt ist.